

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Untersuchungen über das Auftreten seniler Plaques und einer assoziierten Gliazellaktivierung im Gehirn alter Hunde

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
STEPHANIE DOMINIQUE CZASCH

Gießen 2001

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.

Untersuchungen über das Auftreten seniler Plaques und einer assoziierten Gliazellaktivierung im Gehirn alter Hunde

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim

Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

STEPHANIE DOMINIQUE CZASCH

Tierärztin aus Frankfurt am Main (Hessen)

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph. D.

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Hummel

Tag der mündlichen Prüfung:

18. Juli 2001

Die Anfertigung dieser Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium nach dem Hessischen Gesetz zur Förderung von Nachwuchswissenschaftlern (HGFöN) und ein Forschungsstipendium der Akademie für Tiergesundheit e. V. (AfT) gefördert.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Amyloid.....	3
2.1.1 Grundprinzip der Amyloidosen	3
2.1.2 Nachweismethoden für Amyloid	4
2.1.3 Amyloidoseformen und Amyloidtypen	5
2.2 Altersabhängige Veränderungen im Gehirn von Mensch und Hund.....	8
2.2.1 Alzheimer-Krankheit des Menschen	11
2.2.2 Pathogenese der Alzheimer-Krankheit	13
2.2.3 Kognitive Dysfunktion und Verhaltensänderungen des alten Hundes	20
2.2.4 Plaques im Hundehirn	21
2.2.5 Pathogenese der Plaques im Hundehirn.....	22
2.3 Senile Plaques und neurofibrilläre Bündel im Gehirn verschiedener Tierspezies.....	24
3 Material und Methoden	27
3.1 Hunde	27
3.2 Organproben für Histologie, Histochemie und Immunhistologie.....	28
3.2.1 Herstellung der Paraffinblöcke	28
3.2.2 Herstellung der Gefrierblöcke	28
3.2.3 Untersuchte Gehirnregionen	29
3.3 Histochemische Färbeverfahren	31
3.3.1 Protokoll der Silberfärbung nach Campbell-Switzer.....	31
3.3.2 Protokoll der Silberfärbung nach Reusche	32
3.3.3 Protokoll der Silberfärbung nach Bielschowsky (modifiziert).....	32
3.3.4 Protokoll der Silberfärbung nach Bodian (modifiziert).....	32
3.3.5 Protokoll der Silberfärbung nach Gallyas.....	33
3.3.6 Protokoll der Kongorot-Färbung	34
3.3.7 Kontrollen	34
3.4 Immunhistologie	34
3.4.1 Seren und Antikörper.....	35
3.4.2 Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode) für Paraffinschnitte	37

3.4.3	Doppelmarkierung	39
3.4.4	Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode) für Gefrierschnitte.....	39
3.4.5	Kontrollen	40
3.5	TUNEL-Methode für den Nachweis apoptotischer Zellen	40
3.5.1	Kontrollen	41
3.6	Auswertung der Schnitte.....	41
3.7	Statistische Analyse	43
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Merkmale der untersuchten Hunde.....	45
4.1.1	Altersverteilung	45
4.1.2	Gewichtsverteilung.....	45
4.1.3	Rassenverteilung.....	46
4.2	Methodenvergleich.....	47
4.2.1	Immunhistologie	48
4.2.2	Histochemie	48
4.2.3	Morphometrie und statistische Auswertung.....	51
4.3	Pathologisch-histologische Untersuchung des Gehirns	53
4.3.1	Übersichtsauswertung.....	53
4.3.2	Altersabhängige pathologisch-histologische Gehirnveränderungen	53
4.3.3	Statistische Auswertung.....	55
4.4	Klinik.....	55
4.5	Nachweis des β A4-Proteins in Plaques und Gefäßen.....	57
4.5.1	Alters-, geschlechts- und rasseabhängiges Auftreten.....	57
4.5.2	Morphologie der β A4-Proteinablagerungen in Plaques und Gefäßen.....	61
4.5.3	Topographie.....	63
4.6	Nachweis des Amyloidvorläuferproteins.....	66
4.6.1	Junge Hunde	66
4.6.2	Alte Hunde.....	66
4.6.3	Statistische Auswertung.....	67
4.7	Nachweis aktivierter Gliazellen.....	67
4.7.1	MHC Klasse II-positive Mikrogliazellen	67
4.7.2	BS-1-positive Zellen.....	69
4.7.3	GFAP- und Vimentin-positive Zellen	70
4.7.4	Doppelmarkierung.....	71

4.8	Nachweis pro-inflammatorischer Zytokine	72
4.9	Nachweis TUNEL-positiver Zellen	73
4.10	Histologische Abbildungen.....	75
5	Diskussion.....	129
5.1	Methodenvergleich.....	129
5.2	Neuropathologische Befunde beim alten Hund	133
5.3	Morphologische Charakterisierung der β A4-Proteinablagerungen	136
5.4	Pathogenese und Folgen der Plaques.....	141
6	Zusammenfassung	153
7	Summary	157
8	Literaturverzeichnis	161
9	Anhang.....	191
9.1	Bezugsquellen für Chemikalien und Antikörper	191
9.2	Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel.....	194
9.3	Lösungen und Puffer.....	195
9.3.1	Immunhistologie	195
9.3.2	Histochemie	196
9.4	Untersuchte Hunde und anamnestischer Fragebogen	200
9.4.1	Untersuchte Hunde	200
9.4.2	Anamnestischer Fragebogen.....	205
9.5	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	206
	Danksagung.....	207

1 Einleitung

Alterungsvorgänge im zentralen Nervensystem (ZNS) werden bei Menschen (Beljahow, 1889; Simchowicz, 1911; Dayan, 1970; Hubbard und Anderson, 1981a; Brody, 1992; Langui et al., 1995) und Tieren (Cork et al., 1987 und 1988; Borrás et al., 1999) von zahlreichen Veränderungen begleitet. Im Gehirn des Menschen finden sich im Verlauf des normalen Alterungsprozesses und im Rahmen schwerer neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit und dem Down-Syndrom charakteristische histopathologische Veränderungen wie Plaques, neurofibrilläre Bündel und eine kongophile Angiopathie (Alzheimer, 1906; Masters, 1984; Probst et al., 1991; Perry et al., 1997). Plaques bestehen aus einem 4 kDa großen Peptid, dem β A4-Protein oder β -Amyloid, das durch Proteolyse aus einem Vorläufermolekül, dem "amyloid precursor protein" (APP), entsteht (Glenner und Wong, 1984a und b; Beyreuther et al., 1991; Younkin, 1991; Hendriks und van Broeckhoven, 1996). Neurofibrilläre Bündel setzen sich aus einem hyperphosphorylierten, Mikrotubuli-assoziierten Protein, das Tau-Protein genannt wird, zusammen und liegen im Zytoplasma von Neuronen (Braak et al., 1996a und b). Als kongophile Angiopathie werden β A4-Proteinablagerungen in den Gehirngefäßen bezeichnet, die mittels der Kongorot-Färbung eine typische Doppelbrechung im polarisierten Licht (Dichroismus) aufweisen (Glenner und Wong, 1984b; Mandybur, 1986; Coria et al., 1987). In neueren tiermedizinischen Studien wurden Plaques in den Gehirnen alter Hunde (Giaccone et al., 1990; Shimada et al., 1992; Uchida et al., 1993; Russel et al., 1996; Cummings et al., 1996; Borrás et al., 1999), alter Affen (Cork et al., 1987; Martin et al., 1994; Härtig et al., 1997), Bären (Cork et al., 1988; Uchida et al., 1995), Schafen (Braak et al., 1994; Nelson et al., 1994) und Ziegen (Braak et al., 1993) beschrieben. Einzelne Studien weisen darüber hinaus auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Plaques im Gehirn und einer damit einhergehenden kognitiven Dysfunktion und Verhaltensänderungen bei alten Hunden hin (Cummings et al., 1993, 1996 a; Head et al., 1995, 1997, 1998). Molekularbiologische Untersuchungen fanden eine Homologie zwischen der kaninen und der humanen Aminosäuresequenz des β A4-Proteins, weshalb der Hund eine der wenigen Tierspezies darstellt, die spontane β A4-Proteinablagerungen im Gehirn entwickelt (Johnstone et al., 1991). Aufgrund morphologischer Unterschiede werden die Plaques des Menschen in zwei Formen eingeteilt, die unterschiedliche Stadien eines hypothetischen, fortschreitenden Kondensationsprozesses darstellen (Rozemuller et al., 1989; Griffin et al., 1995). Der diffuse Plaque, der als mögliche initiale Form der Plauegenese angesehen wird, besteht aus herdförmigen β A4-Pro-

teinablagerungen ohne dystrophische Neuriten (Rozemuller et al., 1989; Cummings et al., 1996c). Klassische bzw. neuritische Plaques weisen einen kondensierten, zentral-ständigen Amyloidkern auf, der von dystrophischen Neuriten und Gliazellen umgeben wird (Probst et al., 1991). Für den Menschen werden Gefäße (Beyreuther et al., 1991), zirkulierende Blutzellen (Suh et al., 1997; Li et al., 1998), Neuronen (Beyreuther et al., 1991; Hartmann et al., 1997) und Gliazellen (Griffin et al., 1998) als Ursprungsquelle für das β A4-Protein diskutiert. Weiterhin könnten die Aktivität von Plaque-assoziierten Mikrogliazellen und Astrozyten, die pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) synthetisieren, an der Plaqueentstehung und -kondensation beteiligt sein (Eikelenboom et al., 1996; Sheng et al., 1997; Griffin et al., 1998). Die Ätiopathogenese der β A4-Proteinablagerungen und der damit assoziierten Erkrankungen wie z. B. die Alzheimer-Krankheit des Menschen ist trotz zahlreicher Untersuchungen noch weitgehend unklar. Bisher finden sich nur wenige Studien, die sich mit der Entstehung und den Folgen der Plaques im Gehirn alter Hunde beschäftigen, daher wurde die vorliegende Studie in einen methodischen und einen morphologisch-pathogenetischen Teil untergliedert.

Ziel dieser Arbeit war es, unterschiedliche histochemische und immunhistologische Methoden hinsichtlich ihrer Sensitivität zum Nachweis von Plaques, neurofibrillären Bündeln und einer kongophilen Angiopathie im Gehirn des Hundes zu untersuchen und die Morphologie und Lokalisation der Veränderungen zu beschreiben. Einen Einblick in die Pathogenese der β A4-Proteinablagerungen sowie deren Auswirkung auf Neurone sollten Untersuchungen über das Verteilungsmuster des Amyloidvorläuferproteins ("amyloid precursor protein"), die Astrozyten- und Mikrogliazellaktivierung, die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α) und der Neuronendegeneration geben.

2 Literaturübersicht

2.1 Amyloid

Unter dem Begriff Amyloid wird ein homogener, extrazellulär in unterschiedlichen Geweben abgelagerter, Glykoprotein-Komplex verstanden. Der Name Amyloid stammt vom lateinischen Amylum = Stärke ab (Cohen, 1987). Amyloid setzt sich aus Proteinen, die in β -Faltblattstruktur angeordnet sind, einer sog. P-Komponente und einem Glykoproteinanteil zusammen (Westermarck, 1998). Elektronenmikroskopisch finden sich unverzweigte 7,5 bis 10 nm breite β -Amyloidfibrillen. Die P-Komponente des Amyloids ist ein Glykoprotein, das sich in elektronenmikroskopischen Untersuchungen als pentagonale Ringstruktur darstellt. Dieses Protein bewirkt die Anfärbbarkeit des Amyloids mit Jod (Lugolsche Lösung). Weiterhin finden sich in Vergesellschaftung mit allen Amyloidtypen des Menschen Proteoglykane wie das Heparansulfat-haltige Glykosaminoglykan oder Dermatan-sulfat-Proteoglykan (Westermarck, 1998). Amyloidablagerungen sind alkohol- und wasserunlöslich und widerstandsfähig gegen Proteolyse. Diese Proteolyseresistenz weisen alle Amyloidformen auf; trotzdem handelt es sich beim Amyloid nicht um eine einheitliche chemische Substanz (Westermarck, 1998). Für den Menschen konnten mittels biochemischer Untersuchungen 18 verschiedene Vorläuferproteine identifiziert werden, von denen sich die unterschiedlichen Amyloidtypen ableiten. Die Kombination aus Amyloidfibrillen, der P-Komponente und den Proteoglykanen der extrazellulären Matrix wird unter dem Begriff Amyloid zusammengefaßt (Cohen et al., 1987; Westermarck, 1998).

2.1.1 Grundprinzip der Amyloidosen

Eine Amyloidose entsteht auf der Grundlage einer fortschreitenden Ablagerung von Amyloidfibrillen im Gewebe (Glenner, 1980). Amyloid lagert sich bevorzugt an Basalmembranen und Bindegewebsfasern in unterschiedlichen Organen ab (Yamaguchi et al., 1992). Für alle Amyloidosen wird ein einheitliches Prinzip der Amyloidfibrillengenesse postuliert, obwohl die einzelnen Schritte bis heute noch weitgehend unklar sind (Kisilevsky et al., 1997). Hierzu gehören eine Überexpression und/oder Mutationen des Vorläuferproteins (Levy-Lahad et al., 1996), eine abnorme proteolytische Spaltung (Younkin, 1991) und die Bildung amyloidoge-

ner Peptide, die zum sogenannten "self-assembly" fähig sind (Pike et al., 1993, 1996; Ma et al., 1994; Kelly, 1997; Booth et al., 1997).

2.1.2 Nachweismethoden für Amyloid

Amyloid läßt sich von anderen hyalinen Materialien (z.B. Kollagen und Fibrin) durch seine charakteristische Anfärbbarkeit mittels histochemischer und immunhistologischer Techniken unterscheiden. Im HE-gefärbten Schnitt erscheint das Amyloid als eosinophil-gefärbte, azelluläre, homogene Substanz.

Für die Darstellung von **Amyloidablagerungen in viszerale Organen** (z.B. Niere, Leber, Pankreas, Darm) werden häufig histochemische Färbungen verwendet. In der sogenannten Jodreaktion mit Lugolscher Lösung stellt sich Amyloid mahagonibraun und nach Zusatz von Schwefelsäure blau dar. Das Anfärben mittels einer Methylviolett-Lösung läßt Amyloid rot-violett erscheinen (Romeis, 1989). In der Fluoreszenzmikroskopie kann Amyloid, eine Substanz ohne Eigenfluoreszenz, durch Aufbringen eines Fluorochroms wie z.B. Thioflavin S unter UV-Lichtanregung zur Entsendung eines charakteristischen gelb-grünen Fluoreszenzlichtes angeregt werden (Cummings et al., 1996 c). Eine weitere Methode zur Identifizierung von Amyloid ist die Kongorot-Färbung (Puchtler et al., 1962). Der Farbstoff Kongorot hat eine hohe Affinität zu den in β -Faltblattstruktur angeordneten Proteinketten des Amyloids und lagert sich zwischen diesen ein (Cohen et al., 1987). Im polarisierten Licht zeigt das Amyloid dann aufgrund einer Doppelbrechung des polarisierten Lichts eine grün schimmernde Farbe (Dichroismus). Eine histochemische Methode für die Unterscheidung des AA-Amyloids von anderen Amyloidtypen des Menschen ist die Behandlung der mittels Kongorot gefärbten Schnitte mit einer Kaliumpermanganatlösung. Nur das AA-Amyloid verliert nach der Behandlung mit Kaliumpermanganat die Fähigkeit zur Doppelbrechung des polarisierten Lichtes (Linke und Trautwein, 1989). Neben den histochemischen Methoden für den Amyloidnachweis kommen für eine nähere Charakterisierung des Amyloidtyps immunhistologische Nachweismethoden unter Verwendung von Antisera und Antikörpern zum Einsatz (Miura et al., 1990; Schroder und Linke, 1999).

Amyloidablagerungen im menschlichen Gehirn, die in Form von Plaques im Neuropil und in Gefäßen auftreten, können mittels histochemischer Methoden und immunhistologischer Methoden dargestellt werden. Der Amyloidkern in klassischen Plaques, dessen β A4-Protein eine β -Faltblattstruktur aufweist, ist durch die Kongorot-Färbung und die Thioflavin S-Methode anfärbbar (Probst et al., 1991). Andere Plaqueformen, die kein β A4-Protein in β -Faltblattstruktur aufweisen, sind Kongorot-negativ. Diese können allerdings mit Hilfe

verschiedener Versilberungstechniken markiert werden (Yamaguchi et al., 1988). Folgende Versilberungstechniken werden in humanmedizinischen Studien häufig verwendet: die modifizierte Methode nach Bielschowsky (Yamamoto und Hirano, 1986) und seltener die nach Campbell-Switzer (Campbell et al., 1987), nach Reusche (Rosenwald et al., 1993) und nach Bodian (modifiziert, Kondoh et al., 1993). Die Methode nach Gallyas (Gallyas, 1971) dient insbesondere der Darstellung neurofibrillärer Veränderungen wie z.B. neuritischer Plaques, neurofibrillärer Bündel und der sogenannten Neuropilfäden, die nicht aus β A4-Protein, sondern aus Tau-Protein bestehen. Die Versilberungstechniken beruhen auf einer Imprägnation des Gewebes mit Silberionen. Der Grund für die selektive Anfärbbarkeit des Amyloids ist weitgehend unklar. Das Gewebe wird mit Metallionen imprägniert (Silberlösung), diese werden in einem Entwicklungsprozeß reduziert (Formalin-haltige Lösungen) und anschließend fixiert (Natriumthiosulfatlösungen). Die Methoden nach Campbell-Switzer und Gallyas zeichnen sich durch einen sogenannten physikalischen Entwicklungsprozeß aus. Die Entwicklerlösung enthält eine reduzierende Substanz (Formalinlösung) und Silberionen. Die Silberionen werden zu Silber reduziert und die initialen Silberkörnchen nehmen durch das Anlagern weiterer Silberpartikel in der Größe zu, so daß sie mikroskopisch sichtbar werden. In einigen Versilberungstechniken ist ein Tönen der Schnitte mit Goldchlorid vorgesehen. Hierbei schlägt sich metallisches Gold anstelle des Silbers nieder. Dies führt zu einer stärkeren Schwarzfärbung der imprägnierten Gewebeanteile und einer Abschwächung der Hintergrundfärbung. Darüber hinaus macht diese Vergoldung in Verbindung mit anschließender Fixierung die Färbung haltbarer gegen vorzeitiges Ausbleichen (Romeis, 1989). Weiterhin wird die Immunhistologie zur Darstellung von Plaques genutzt (Glenner und Wong, 1984b; Ikeda et al., 1987; Yamaguchi et al., 1989; Probst et al., 1991).

2.1.3 Amyloidoseformen und Amyloidtypen

Die Amyloidosen der Tiere und des Menschen werden eingeteilt in systemische und lokalisierte Formen, je nach vorliegender Organbeteiligung (Matthias und Jakob, 1968; Geisel und Linke, 1997). Weiterhin spricht man von primärer Amyloidose, wenn eine spontane fehlerhafte Synthese von Immunglobulinen durch Lymphozyten (Myelom-assoziierte Gammopathien) vorliegt, und von sekundären Amyloidosen, wenn sie im Verlauf chronischer Infektionen auftreten.

Bei **Tieren** entsteht AL-Amyloid (Immunamyloid) durch fehlerhaft synthetisierte und unvollständig abgebaute Immunglobuline im Verlauf von myeloischen Neoplasien, z.B. dem Myelom des Hundes (Ramos-Vara et al., 1998). Auch in der Haut und der Nase von Pferden fin-

den sich AL-Amyloidablagerungen (Linke und Trautwein, 1989; Linke et al., 1991). AA-Amyloid entsteht in der Folge chronisch verlaufender Infektionskrankheiten mit Persistenz eines Antigens im Organismus. In der Leber entstehen unter dem Einfluß von Zytokinen (IL-1 und IL-6) vermehrt Akute-Phase-Proteine wie z.B. Serum-Amyloid-A-Protein, C-reaktives Protein und α -Globulin, deren Spaltprodukte als Amyloid abgelagert werden (Slauson et al., 1970; Shirahama und Cohen, 1985; Takahashi et al., 1985; Cohen und Connors, 1987). Familiäre Amyloidosen, die mit AA-Amyloidablagerungen überwiegend in den Nieren einhergehen, werden für Abessinierkatzen und Somalikatzen (van der Linde-Sipman et al., 1997; Boyce et al., 1984) beschrieben. Erbliche Prädispositionen für systemische Amyloidosen kommen beim Shar Pei (DiBartola et al., 1990) und Grauen Collies (Cheville et al., 1970) vor. Endokrines Amyloid (AE-Amyloid, endokrines Amyloid) entsteht aus Polypeptidhormonen, die von APUD-Zellen ("amine precursor uptake and decarboxylation"), das sind C-Zellen der Schilddrüse, Inselzellen des Pankreas und enterochromaffine Zellen des Magen-Darmkanals, gebildet werden. Katzen mit einem altersbedingten Diabetes mellitus weisen häufig AE-Amyloidablagerungen in den Langerhansschen Inseln auf (Jakob, 1970; Lutz und Rand, 1995). Weiterhin wurde für den Hund eine auf die Gefäße der Lunge begrenzte Amyloidose beschrieben (Schuh, 1988), die sich von einem Apolipoprotein (Apo AI) herleitet und mit zunehmendem Alter des Tieres in mittelgroßen Lungenarterien auftritt (Johnson et al., 1992b; Roertgen et al., 1995).

Zerebrale Amyloidosen bei Tieren mit β A4-Proteinablagerungen (Altersamyloid) wurden bisher bei alten Hunden, Primaten, Bären, einem Vielfraß, einem Kamel und bei einem Specht beschrieben (Cork et al., 1988; Cork et al., 1990; Uchida et al., 1990, 1991, 1992a und b, 1993, 1995, 1997; Price et al., 1991; Martin et al., 1991, 1994; Nakamura et al., 1995, 1996a und b und c, 1997; Cummings et al., 1993, 1996a und b und d; Gearing et al., 1997; Härtig et al., 1997; Sloane et al., 1997; Borrás et al., 1999; Nakayama et al., 1999). Spongiforme Enzephalopathien mit Prion-Protein^{Sc}-Ablagerungen (Prusiner et al., 1982, Meyer et al., 1986) fanden sich bei Erkrankungen wie z.B. Scrapie des Schafes (Prusiner et al., 1982), der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) des Rindes (Wells et al., 1991), der Enzephalopathie der Nerze (Hartsough et al., 1965), der spongiformen Enzephalopathie der Katze (Dormont, 1998) und der transmissiblen Enzephalopathie bei im Zoo gehaltenen Nyalas und Kudus (Kirkwood und Cunningham, 1994).

Beim **Menschen** tritt AL-Amyloid (leichte Ketten der Immunglobuline) primär oder Myelom-assoziiert auf. AA-Amyloid (Serum-Amyloid-A-Protein) bildet sich im Verlauf chronischer Infektionskrankheiten aus. Eine systemische, erbliche Amyloidose ist das familiäre Mittel-

meerfieber (AA-Amyloid), eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung mit regelmäßigen Fieberattacken unklarer Ursache und Polyserositis (Kastner, 1998). Eine zweite Form der erblichen Amyloidosen stellt die autosomal-dominant vererbte familiäre Amyloidpolyneuropathie (ATTR-Amyloid) dar, bei der es zu Amyloidablagerungen in allen peripheren Nerven des Körpers kommt (Coelho, 1996). Genmutationen im Transthyretin-Gen (Serumprotein für den Transport von Thyroxin und Retinol) und Apolipoprotein-Gen (APO AI) gehen mit einer Kardiomyopathie und Polyneuropathie einher (Yi et al., 1991). Familiäre Amyloidosen in Finnland sind an eine Mutation des Gelsolin-Gens gekoppelt (Aktin-bindendes Protein; Maury, 1991). Bei Langzeitdialysepatienten zirkuliert β_2 -Mikroglobulin, eine Komponente des MHC Klasse I Moleküls, in hoher Konzentration im Blut, da dieses Protein die Dialysemembranen nicht passieren kann. β_2 M-Amyloid lagert sich bei diesen Patienten bevorzugt in Sehnenscheiden und Gelenken ab (Campistol und Argiles, 1996). Lokale Amyloidablagerungen im Herzen (Storkel et al., 1983; Mucchiano et al., 1992) alter Menschen bestehen aus ATTR-Amyloid, das sich aus Transthyretin, einem Serumprotein, das Thyroxin und Retinol im Blut transportiert, zusammensetzt. Endokrine Amyloidosen finden sich bei Typ 2 Diabetes mellitus des Menschen als AIAPP-Amyloid (Inselzellamyloid-Peptid), bei Schilddrüsenkarzinomen als ACal-Amyloid (Calcitonin) und bei atrialen Amyloidosen des Herzens als AANF-Amyloid (atrialer natriuretischer Faktor) (Yano et al., 1981; Johnson et al., 1992 a; O'Brien et al., 1993).

Zerebrale Amyloidosen des Menschen treten im Rahmen der Alzheimer-Krankheit (β A4-Protein; Roses, 1996), des Down-Syndroms (β A4-Protein; Masters et al., 1985b), zerebraler Amyloidangiopathien (β A4-Protein; Mandybur, 1986) wie der "hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis Dutch type" (HCHWA-D, β A4-Protein-Variante; Maat-Schieman et al., 2000) und der "hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis Icelandic type" (HCHWA-I, Cystatin C-Variante; Benedikz et al., 1999) und bei übertragbaren spongiformen Enzephalopathien wie dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom, der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und der Kuru-Krankheit (Prionprotein-Variante) auf (Castano und Frangione, 1991; Hainfeller, 1998).

2.2 Altersabhängige Veränderungen im Gehirn von Mensch und Hund

Die Gehirne **alter, nicht-dementer Menschen** weisen ab dem ca. 60. Lebensjahr makroskopisch erfaßbare Veränderungen auf (Perry und Kay, 1997). In den meisten Fällen liegt eine Fibrose der Leptomeninx vor. Weiterhin fällt eine Atrophie der Großhirnwindungen der medialen Anteile des Lobus temporalis auf (Dekeban und Sadowsky, 1978). Neben dem Schwund der grauen Substanz findet sich eine Abnahme der periventrikulären weißen Substanz (Hubbard und Anderson, 1981a) und eine Ausweitung der Seitenventrikel (Barron et al., 1976). Die genannten Veränderungen werden unter dem Begriff der Hirnatrophie zusammengefaßt. Im Rahmen der Hirnatrophie kommt es zum Neuronenverlust (Hubbard und Anderson, 1981b; Anderson et al., 1983; Brody, 1992) und einer Abnahme der synaptischen Verbindungen (Masliah et al., 1993). Als Kompensationsmechanismus wird eine Zunahme der Kontaktfläche der restlichen Synapsen gedeutet (Cragg, 1975; Adams, 1987).

Senile Plaques wurden beim Menschen erstmalig von Beljahow 1889 morphologisch beschrieben (Beljahow, 1889). Senile Plaques stellen keine einheitliche Struktur dar, sondern setzen sich aus verschiedenen Komponenten zusammen und werden anhand ihrer Morphologie in zwei Gruppen eingeteilt (*Abb. 1*). Die klassischen bzw. neuritischen Plaques (*B* und *C*) bestehen aus einem zentral-ständigen, kondensierten β A4-Protein-haltigen Kern, der von einem Kranz dystrophischer Neuriten durchzogen und umgeben wird. Diese Plaques sind zwischen 5 und 200 μ m groß. In ultrastrukturellen Untersuchungen bestätigte sich, daß der Kern aus extrazellulär abgelagerten Amyloidfibrillen besteht. In den dystrophischen

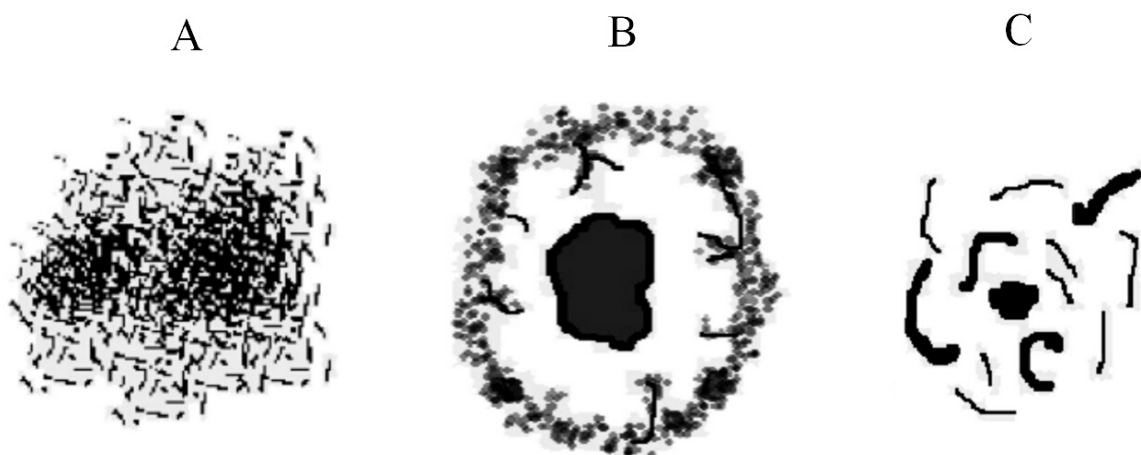


Abbildung 1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Plaqueformen: Diffuser Plaque (A), klassische/neuritische Plaques mit einem kondensierten Amyloidkern (B und C).

Nervenzellfortsätzen fanden sich degenerierte Mitochondrien und Lysosomen (Kidd, 1964). Daneben werden diffuse Plaques (A) beschrieben, die nur aus β A4-Protein bestehen (Yamaguchi et al., 1989). Diffuse Plaques sind in der Lichtmikroskopie mittels HE-Färbung nur schwer erkennbar, und histochemische Spezialfärbungen wie Versilberungstechniken und immunhistologische Methoden sind für ihre Darstellung nötig.

Die Mehrzahl der Plaques in den Gehirnen nicht-dementer alter Menschen (ab dem 60. Lebensjahr) sind diffuse Plaques (Dayan, 1970; Miyakawa et al., 1982; Storkel et al., 1983; Dickson et al., 1992). Sie liegen hauptsächlich in der Großhirnrinde (Lobus frontalis und Lobus temporalis), im Mandelkern (Nucleus amygdaloideum), im entorhinalen Kortex und Hippocampus. Mit zunehmender Plaquezahl in der Großhirnrinde treten Plaques auch in subkortikalen Kerngebieten wie z.B. dem Hypothalamus und dem Corpus striatum auf. Es gibt widersprüchliche Angaben über die Altersabhängigkeit des Auftretens seniler Plaques beim Menschen. Einige Studien fanden positive Korrelationen zwischen zunehmendem Alter und dem Vorkommen von Plaques (Tomlinson, 1979), andere verneinten dieses (Langui et al., 1995) und wiesen auf eine Zunahme neuritischer Plaques im Verhältnis zu den diffusen Plaques mit ansteigendem Alter hin.

Neurofibrilläre Bündel ("neurofibrillary tangles") wurden erstmals von Alois Alzheimer, einem Neurologen, im Jahre 1906 beschrieben (Alzheimer, 1906). Sie liegen im Zytoplasma von Neuronen und bestehen aus einem hyperphosphorylierten, proteaseresistenten, Mikrotubuli-assoziierten Tau-Protein (Goldman et al., 1986). Im Elektronenmikroskop stellen sich neurofibrilläre Bündel als lange, paarig angeordnete und in einer Doppelhelix gewundene, unverzweigte Filamente dar, die alle 80 nm eine 10 nm lange Einziehung aufweisen (Kidd, 1964; Wisniewski et al., 1989; Wrzolek et al., 1992). Ebenso wie die Plaques sind neurofibrilläre Bündel in der Lichtmikroskopie mittels HE-Färbung nur schlecht erkennbar, und es sind Versilberungstechniken und immunhistologische Untersuchungen nötig, um sie deutlich darzustellen (Braak und Braak, 1991b, 1996a und b). In immunhistologischen Studien konnten drei unterschiedliche Formen bzw. Reifegrade der neurofibrillären Bündel beschrieben werden. Primär entstehen fibrilläre, Tau-positive, stabförmige Strukturen im Zytoplasma von Neuronen, möglicherweise aufgrund eines gestörten axonalen Transportes (Praprotnik, 1996). Aus diesen entwickelt sich dann die klassische Form mit wollknäuelartig um den Zellkern gewundenen Fibrillen. In einem späteren Stadium ist die Zellmembran des Neurons nicht mehr vorhanden, und die neurofibrillären Bündel liegen als "ghost tangles" frei im Neuropil (Tabaton et al., 1991). Diese lassen sich nicht nur immunhistologisch mittels Antikörpern gegen Tau-Protein markieren, sondern auch mit der Kongorot-Färbung,

Thioflavin S und Antikörpern gegen GFAP und β A4-Protein (Bancher et al., 1989; Tabaton et al., 1991). Im Gehirn alter, nicht-dementer Menschen treten neurofibrilläre Bündel selten in den Neuronen der Großhirnrinde (Lobus frontalis und Lobus temporalis), des Mandelkerns (Nucleus amygdaloideum), des Hippocampus und des entorhinalen Kortex auf (Jamada, 1968; Braak und Braak, 1991a; Probst et al., 1991; Dickson et al., 1992).

Eine β A4-Proteinablagerung in Gefäßen, die aufgrund der in β -Faltblattstruktur vorliegenden und damit Kongorot-positiven Proteine auch **kongophile Angiopathie** genannt wird, beschrieb erstmals Pantelakis (1954). Das β A4-Protein findet sich in der Tunica media und Tunica adventitia kleiner Arterien und Arteriolen der Leptomeninx und der Großhirnrinde (Esiri und Wilcock, 1986; Yamaguchi et al., 1992; Perry and Kay, 1997). Kapillaren und Venen sind weniger häufig betroffen (Meier-Ruge et al., 1980; Shinkai et al., 1995). 30% aller Menschen über 60 Jahren weisen β A4-Proteinablagerungen in den zerebralen Gefäßen auf (Esiri und Wilcock, 1986). Diese finden sich vorwiegend im parietalen und temporalen Kortex. Hochgradige β A4-Proteinablagerungen können durch eine fibrinoide Nekrose der Gefäßwand zu Blutungen und Thrombosen führen (Mandybur, 1986).

Weiterhin treten beim Menschen in Abhängigkeit vom Alter Ablagerungen unterschiedlicher **Pigmente** wie z.B. Lipofuszin, Ceroid und Neuromelanin in Neuronen auf (Brody, 1960; Mann, 1974, 1978). Eine Beeinträchtigung des Zellmetabolismus durch Pigmenteinlagerungen ist nur für Neuronen der Substantia nigra durch Neuromelaninspeicherungen nachgewiesen (Mann, 1974, 1978). Darüber hinaus wird der Alterungsprozeß des Gehirns von Gliazellreaktionen, insbesondere von einer Astroglie, begleitet, die mit einer Zunahme der Zellzahl, der Zellgröße und einer erhöhten GFAP-Expression der Einzelzelle einhergeht (Mandicardi et al., 1983; Mandybur und Chuirazzi, 1990; Eng et al., 1994; Arnold et al., 1991; Beach et al., 1989). Häufig weisen reaktive Astrozyten zusätzlich eine Vimentin-Reexpression auf, die normalerweise nur in fetalen Astrozyten zu finden ist (Arnold et al., 1991).

Im Gehirn **alter Tiere** findet sich makroskopisch eine Fibrose der Leptomeninx und eine Ventrikelvergrößerung (Wisniewski et al., 1970; Uchida et al., 1991; Shimada et al., 1991, 1992; Cummings et al., 1993, 1996 b; Russel et al., 1996; Su et al., 1998; Borrás et al., 1999). Eine Hirnatrophie, wie sie bei alten Menschen beobachtet wird, kann bei Tieren makroskopisch nicht nachgewiesen werden (Reifinger et al., 1997), wohingegen "magnetic resonance imaging" (MRI)-Untersuchungen von Su et al. (1998) eine deutliche Ausweitung der Ventrikel in Verbindung mit einer Atrophie der Großhirnrinde bei alten Hunden zeigen. Von Braunmühl beschrieb 1956 im Rahmen histologischer Untersuchungen von Gehirnen alter Hunde eine kongophile Angiopathie und erstmals „Alzheimer-ähnliche Plaques“, wie sie

bis dahin nur im Gehirn des Menschen bekannt waren (von Braunmühl, 1956; Matthias und Jakob, 1968). Diese amorphen Plaques fanden sich im Kortex verteilt und ließen sich mit Versilberungstechniken darstellen (von Braunmühl, 1956). 1970 beschrieben Wisniewski et al. (1970) zusätzlich zu diesen diffusen Plaques sogenannte klassische senile Plaques, die sich aus einem Amyloidkern, degenerierten Neuriten und einzelnen, assoziierten Gliazellen zusammensetzen (Probst et al., 1991). Ebenso wiesen Pauli und Luginbühl (1971) auf die ähnliche Morphologie der humanen und kaninen Plaques hin. Eine zerebrale Altersamyloidose beim Hund stellt die kongophile Angiopathie dar (Dahme, 1962; Fankhauser und Luginbühl, 1968; Dahme und Schröder, 1979; Dahme, 1994). Als Folge der Amyloidablagerungen in Gehirngefäßen bildet sich eine Degeneration der glatten Muskelzellen aus (Dahme und Sprengler, 1976), die in der Folge mit Gehirnblutungen einhergehen kann (Dahme und Schröder, 1979; Dahme, 1994). Weiterhin finden sich Pigmentablagerungen, wie z. B. Lipofuszin, bei Hunden mit zunehmendem Alter in den großen Neuronen des Kortex (Pyramidenzellen), des Hippocampus und des Thalamus (Wisniewski et al., 1970; Shimada et al., 1991; Borrás et al., 1999).

Berichte über Veränderungen in der weißen Substanz des Hundehirns weisen auf eine altersabhängige Zunahme Ubiquitin- und PAS-positiver Granula zwischen den Myelinscheiden und im Zytoplasma von Oligodendrozyten und Makrophagen in der weißen Substanz des Groß- und Kleinhirns von Hunden hin, die eine Desorientierung und Inkontinenz aufwiesen (Ferrer et al., 1993). Ubiquitin markiert Proteine, die für den proteolytischen Abbau bestimmt sind (Lowe et al., 1988; Dickson et al., 1990).

2.2.1 Alzheimer-Krankheit des Menschen

Alois Alzheimer (1864-1915) arbeitete in Frankfurt am Main und in München als Wissenschaftler und Psychiater. In München war er Assistent von Emil Kraepelin, der nach der berühmten Veröffentlichung Alzheimers über eine „Eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer, 1906) das Eponym der „Alzheimer-Krankheit“ einführte (Maurer et al., 1997). Alzheimer beschreibt erstmals die fortschreitende Demenz einer 51jährigen Frau (Auguste D., Frankfurt am Main) und verknüpft das klinische Bild mit neuropathologischen Veränderungen wie Plaques, neurofibrillären Bündeln und einer kongophilen Angiopathie. Die Alzheimer-Krankheit ist bis heute klinisch schwierig zu diagnostizieren und eine eindeutige Diagnose kann erst post-mortem durch eine histopathologische Untersuchung des Gehirns gestellt werden. Makroskopisch weisen die Gehirne von Alzheimer-Patienten eine hochgradige bilateral symmetrische Atrophie des Lobus temporalis auf.

Histopathologisch gelten folgende Veränderungen im Gehirn als eindeutige Hinweise für das Vorliegen einer Alzheimer-Krankheit: Plaques, neurofibrilläre Bündel und eine kongophile Angiopathie (Abb. 2, A, B, C). Daneben werden oft Hirano-Körperchen (Simchowicz, 1911; Hirano et al., 1966, 1968; Gibson et al., 1977; Galloway et al., 1987), eine granulovakuoläre Degeneration großer Neuronen (Dickson et al., 1987) und Neuropilfäden ("neuropil threads"; Braak und Braak et al., 1986) beschrieben.

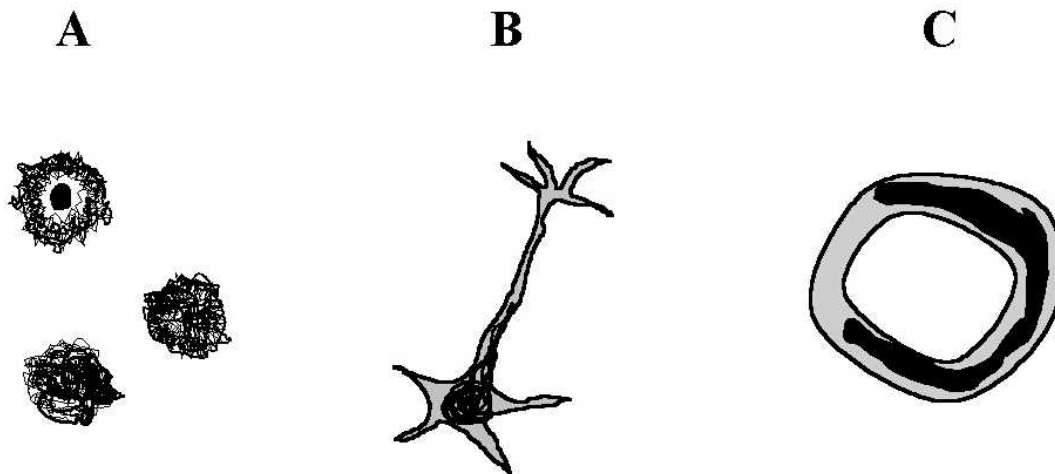


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Alzheimer Trias: Plaques im Neuropil (A), neurofibrilläre Bündel im Zytoplasma von Neuronen (B) und eine zerebrale Amyloidangiopathie (C).

Klassische und diffuse Plaques liegen in höchster Dichte in den Kortexschichten 3 und 5 des frontalen, temporalen und parietalen Kortex und im entorhinalen Kortex vor (Brun et al., 1981; Arnold et al., 1991; Thal et al., 1997). β A4(40)-Protein und β A4(42)-Protein finden sich in unterschiedlicher Beteiligung in den Plaquetypen. Diffuse Formen bestehen überwiegend aus β A4(42)-Protein und in den klassischen Plaques liegt zusätzlich β A4(40)-Protein vor (Iwatsubo et al., 1994; Fukumoto et al., 1996). Neurofibrilläre Bündel liegen in den großen Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus, in Neuronen der Schicht 2 und 4 des entorhinalen Kortex, in Neuronen des Mandelkerns (Nucleus amygdaloideum) und des temporalen Kortex vor (Hyman et al., 1984; Braak et al., 1996a und b).

Im Rahmen einer Standardisierung der neuropathologischen Kriterien für die Diagnose der Alzheimer-Krankheit wurden 1984 die Kriterien nach Khachaturian (Khachaturian, 1985) aufgestellt. Heute gelten die CERAD ("Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease")-Kriterien (Mirra et al., 1991), in denen die zu untersuchenden Gehirnregionen und

die Untersuchungsmethoden (Gallyas-, modifizierte Bielschowsky-, Thioflavin S-Methode) festgeschrieben sind.

Nach Braak und Braak (1991a) werden die neurofibrillären Veränderungen in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten nach Anzahl und Lokalisation in sechs Stadien eingeteilt, die einen fortschreitenden Entwicklungsprozeß widerspiegeln. Stadium 1 und 2 zeichnen sich durch beginnende Neurofibrillenbildung in Neuronen der ento- und transentorhinalen Region und des CA1-Sektors des Hippocampus aus. Dieses Stadium soll mit keinen oder nur geringen neurologischen Symptomen korrelieren. Stadium 3 und 4 zeichnen sich durch ein zusätzliches Auftreten von neurofibrillären Bündeln in Neuronen des limbischen Systems und schließlich Stadium 5 und 6 durch neurofibrilläre Bündel in zahlreichen Neuronen des gesamten Kortex aus. Stadium 5 und 6 gehen mit schweren klinischen neurologischen Ausfällen einher.

Es wird kontrovers diskutiert, welche neuropathologischen Befunde am besten mit dem klinischen Bild der Alzheimer-Demenz korrelieren, neurofibrilläre Bündel (Arriagada et al., 1992; Bierer et al., 1995) oder Plaques. Es gibt Studien, die einen Zusammenbruch der Signalweiterleitung vom Kortex zur Hippocampusformation als Ursache für die klinischen Symptome ansehen. Die wichtigste Einheit stellt die sogenannte limbische Schleife ("limbic loop") dar, die aus kortikalen Neuronen besteht, die Efferenzen zur entorhinalen Region entsenden. Die Neuronen der entorhinalen Region stehen wiederum mit dem Gyrus dentatus und der Hippocampusformation in Verbindung ("perforant pathway"). In den Neuronen des entorhinalen Kortex bilden sich in einem sehr frühen Stadium neurofibrilläre Bündel und hier entstehen auch zu einem frühen Zeitpunkt Plaques (Hyman et al., 1984; Cummings et al., 1996c). Weiterhin finden sich in der Molekularschicht (Stratum moleculare) des Gyrus dentatus und der terminalen Zone der Neuronenausläufer aus der entorhinalen Region sehr häufig Plaques (Hyman et al., 1986). Möglicherweise kommt es durch die Ausbildung der neurofibrillären Bündel in den Neuronen und durch Bildung von Plaques in ihrer terminalen Zone zu Beeinträchtigungen oder Unterbrechungen der Signalweiterleitung von kortikalen zu subkortikalen Zentren (Hyman et al., 1990). Daneben existieren Arbeiten, die die Menge des abgelagerten β A4-Proteins ("amyloid-load") im entorhinalen Kortex allein mit der Schwere der Demenz korrelieren (Cummings et al., 1995, 1996c).

2.2.2 Pathogenese der Alzheimer-Krankheit

Die Inzidenz der Alzheimer Krankheit steigt nach dem 60. Lebensjahr an (Rocca et al., 1991). Es gibt sporadische und familiär-gehäuft auftretende Formen ("familial Alzheimer's disease", FAD), wobei die familiären Formen sich unterteilen lassen in die, die vor dem 60. Lebensjahr

auftreten ("early-onset familial Alzheimer's disease") und die, die sich nach dem 60. Lebensjahr entwickeln ("late-onset familial Alzheimer's disease"). Die familiäre Alzheimer-Krankheit mit frühem Krankheitsbeginn ist mit Mutationen sogenannter "**causative genes**" verbunden, das sind Gene, deren Mutation ausreicht, um eine Alzheimer-Krankheit auszulösen. Zu diesen Genen gehören das "amyloid precursor protein" (APP, Chromosom 21), das Presenilin 1 (PS1, Chromosom 14) und das Presenilin 2 (PS2, Chromosom 1; Masters et al., 1981; Hendriks und van Broeckhoven, 1996; Levy-Lahad et al., 1996; Beyreuther et al., 1991; Lendon et al., 1997).

Bei der familiären Alzheimer-Krankheit mit spätem Krankheitsbeginn und bei ca. 50% der sporadischen Fälle (Dal Forno et al., 1996) wurde ein **Suszeptibilitäts-gen**, d. h. ein Gen, das das Risiko zu erkranken erhöht und den Zeitpunkt des Krankheitsbeginns nach vorne verschiebt, aus der Familie der Apolipoproteine (ApoE ϵ 4, Chromosom 19) identifiziert (Dal Forno et al., 1996; Levy-Lahad et al., 1996). Nur ca. 10% aller Alzheimer-Fälle haben einen genetischen Hintergrund (Lendon et al., 1997), die Ursache der restlichen sporadischen Fälle ist bisher nicht ausreichend geklärt.

Anhand der sogenannten Dementia pugilistica, einer Erkrankung bei Berufsboxern, die mit Alzheimer-ähnlicher Demenz und Morphologie einhergeht, wurde deutlich, daß auch starke **Schädel-Hirn-Traumen** einen Risikofaktor darstellen (Graves et al., 1990; Dale et al., 1991; Mc Kenzie et al., 1996). Eine starke Zunahme der APP-Expression in der weißen Substanz nach einem Schädel-Hirn-Trauma wird als Hinweis auf einen axonalen Schaden gedeutet ("diffuse axonal injury"; Gentleman et al., 1993). Experimentell läßt sich eine APP-Aufregulierung in Gehirnen von Mäusen, Gerbils und Schweinen nach Traumatisierung und temporärer Ischämie auslösen (Wakita et al., 1992; Kalaria et al., 1993b; Pierce et al., 1996; Smith et al., 1999; Lin et al., 1999).

Die Annahme, daß **Aluminium** oder andere Metallionen einen Risikofaktor darstellen (McLachlan et al., 1996) oder direkt als Kristallisationspunkt dienen, ist nie abschließend bewiesen worden. Es wird postuliert, daß **Östrogene** das Risiko, an der Alzheimer-Krankheit zu erkranken, mindern oder zumindest den Zeitpunkt des Krankheitsbeginns nach hinten verschieben (Tang et al., 1996).

Beim Menschen konnte das **Amyloidvorläuferprotein** (APP) von Ferreira et al. (1993) in Neuronen des Riechkolbens, der Großhirnrinde, des Hippocampus, des Mandelkerns und des Kleinhirns nachgewiesen werden. Membrangebundenes und lösliches APP wird von Neuronen gebildet und hat Einfluß auf das Neuritenwachstum und die Synapsenplastizität (neuroprotektive Effekte; Ferreira et al., 1993; Mattson et al., 1997). Eine regelmäßige

auftretende Demenz vom Alzheimer-Typ bei Menschen mit Down-Syndrom (Trisomie 21; Burger und Vogel, 1973; Glenner et al., 1984b; Brugge et al., 1994; Masters et al., 1985b; Rocca et al., 1991) weist auf eine enge Verbindung zwischen der Überexpression des APP-Gens und einer gesteigerten Produktion des β A4-Proteins hin. Dies spricht dafür, daß vermutlich eine Akkumulation des β A4-Proteins ausreicht, um kognitive Dysfunktionen auszulösen (Rumble et al., 1989; Cummings et al., 1995). Im Tierversuch wiesen transgene Mäuse mit einer Überexpression des humanen APP β A4-Proteinablagerungen im Gehirn auf (Lendon et al., 1997). Ebenso führen Mutationen innerhalb des APP-Gens zu einer gesteigerten β A4-Proteinrate (Citron et al., 1992; Cai et al., 1993; Suzuki et al., 1994; Levy-Lahad et al., 1996).

Preseniline (PS) sind transmembranöse Proteine, die im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat gefunden wurden (Cruts et al., 1996; Levy-Lahad et al., 1996; Selkoe et al., 1999). Patienten mit Mutationen der Presenilingene wiesen erhöhte Mengen β A4-Proteinablagerungen im Gehirn auf (Lemere et al., 1996; Lendon et al., 1997). Presenilin 1 wurde immunhistologisch in Neuronen, Mikroglia und Monozyten nachgewiesen (Kim et al., 1997; Xia et al., 1998a). "PS1-knock-out"-Mäuse zeigten eine Abnahme der γ -Sekretaseaktivität (DeStrooper et al., 1998). Presenilin, APP sowie β A4(40)- und β A4(42)-Protein wurden gemeinsam aus Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums isoliert, so daß vermutet wird, daß Preseniline und γ -Sekretasen zusammen an der APP-Spaltung beteiligt sind oder aber, daß die Preseniline möglicherweise selbst γ -Sekretasen darstellen (Xia et al., 1998b; Wolfe et al., 1999).

Apolipoprotein E-Polymorphismen (ApoE, Chromosom 19) führten zur Expression unterschiedlicher Allele ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 (Corder et al., 1993). Menschen, die an der Alzheimer-Krankheit leiden, weisen ApoE ϵ 4 über- und ApoE ϵ 2 unterexprimiert auf (Henderson et al., 1995). ApoE ϵ 4 homozygote Alzheimer-Patienten entwickeln sehr viele Plaques und zeigen gleichzeitig eine hochgradige Zunahme aktivierter Mikogliazellen (Egensperger et al., 1998; McNamara et al., 1998). ApoE ϵ 4 fördert *in vitro* die Amyloidfibrillenaggregation (Ma et al., 1994). Im Gegensatz hierzu fanden Yamada et al. (1996) bei alten (über 80 Jahre), nicht-dementen Menschen, die keine Plaques und neurofibrilläre Bündel aufwiesen, nach ApoE-Genotypisierung einen hohen Anteil ApoE ϵ 2 und wenig ApoE ϵ 4. ApoE ϵ 2 wird deshalb eine Funktion als Neuronenschutzfaktor zugesprochen.

Die Alzheimer-Krankheit kann nur durch eine histologische Untersuchung des Gehirns diagnostiziert werden. Die vorgefundenen Läsionen stellen ein weit fortgeschrittenes Bild eines

Krankheitsprozesses dar und lassen nur schwer Aussagen über die Anfänge ihrer Entstehung zu. Besonderes Augenmerk wurde deshalb im Rahmen pathogenetischer Studien auf eine weitere Plaqueform des Menschen gerichtet, die mittels Antikörpern gegen das β A4-Protein in Kombination mit einer Vorbehandlung durch Ameisensäure (Kitamoto et al., 1987; Vinters et al., 1988) darstellbar ist. Diese Plaqueform hat verschiedene Bezeichnungen erhalten, wie z.B. amorphe Plaques (Rozemuller et al., 1989), diffuse Plaques (Yamaguchi et al., 1988) oder "pre-amyloid deposits" (Tagliavini et al., 1988; Mann et al., 1989). Diese diffusen Plaques sind im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Formen sehr unterschiedlich groß (20-1000 μ m) und nicht immer scharf begrenzt. Sie sind nicht mittels Kongorot-Färbung darstellbar, finden sich in allen kortikalen Schichten, weisen meist keine oder nur wenige assoziierte Astrozyten oder Mikrogliazellen auf und werden als initiale Form der β A4-Proteinablagerung im Rahmen des normalen Alterungsprozesses (Morris et al., 1996) und als Anzeichen einer noch nicht klinisch erkennbaren Alzheimer-Krankheit diskutiert (Haga et al., 1989; Rozemuller et al., 1989; Banati et al., 1994; Griffin et al., 1995; Cummings et al., 1996a und c; Eikelenboom and Veerhuis, 1996; Morris et al., 1996; Beach et al., 1997; Sasaki et al., 1997). Die Tatsache, daß sich dieser Plaquetyp nicht mittels der Kongorot-Färbung darstellen läßt, wird als Indiz für die noch nicht ausgebildete β -Faltblattstruktur der Proteinfibrillen gedeutet (Eikelenboom and Veerhuis, 1996). Ultrastrukturelle Studien konnten das Fehlen von Amyloidfibrillen in β -Faltblattstruktur in den diffusen Plaques bestätigen (Yamaguchi et al., 1988; Yamaguchi et al., 1990).

Aus Plaques und meningealen Blutgefäßen von Alzheimer-Patienten (Glenner und Wong, 1984a), Down-Syndrom-Patienten (Glenner und Wong, 1984b) und gesunden, alten Menschen (Coria et al., 1987) konnte immer das gleiche 4 kDa große Peptid isoliert werden (β A4-Protein; Masters et al., 1985b; Beyreuther et al., 1991). Nach Aufklärung der Aminosäuresequenz des Peptids wurde das kodierende Gen für das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) identifiziert (Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1988).

Die Amyloidvorläuferproteine (APP) stellen eine heterogene Gruppe von Polypeptiden dar, die in unterschiedlichen Isoformen im Organismus auftreten (Selkoe et al., 1994). Die Isoformen mit 751 und 770 Aminosäuren treten nur in nicht-neuralem Gewebe, die Formen mit 695 Aminosäuren nur im Gehirn auf. APPs sollen als Rezeptoren bei der Signalübermittlung von Zelle zu Zelle und bei der Internalisation von Kupfer- und Zinkionen mitwirken (Multhaup et al., 1996). *In vitro* Studien weisen auf neurotrope bzw. neuroprotektive Wirkungen des löslichen APP (sAPP) hin (Selkoe et al., 1994; Mattson et al., 1997). In Abhängigkeit von den Proteasen, die das APP spalten, entstehen unterschiedliche Metaboliten. β A4-

Protein wird durch proteolytische Spaltung des Amyloidvorläuferproteins (APP) gebildet (Glenner und Wong, 1984a und b; Selkoe et al., 1986). Das APP ist ein in der Zellmembran verankertes Glykoprotein, das ein extrazelluläres NH₂-Ende und ein intrazelluläres COOH-Ende aufweist.

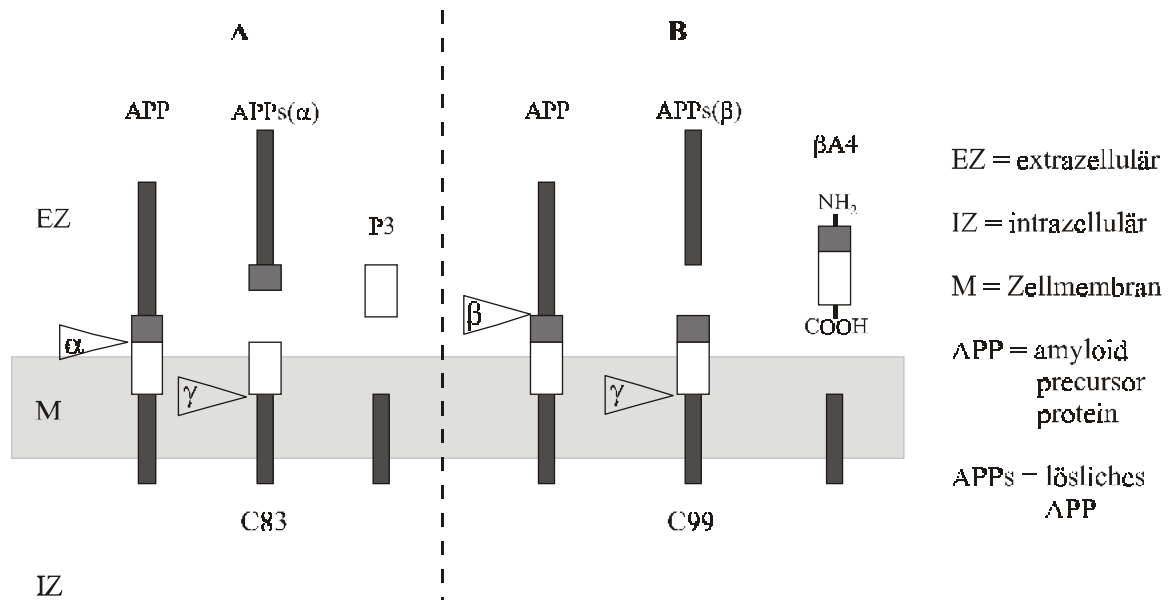


Abbildung 3: Konventionelle (A) und alternative (B) Proteolyse des APP (modifiziert, aus Hendriks und van Broeckhoven, "The β A4 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease", 1996)

APP wird in einem **konventionellen Abbauweg** durch α -Sekretasen in ein lösliches extrazelluläres Fragment (sAPP- α) und in ein weiterhin intramembranös verankertes C-terminales Fragment (C83), beide sind nicht-amyloidogen, gespalten (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1992; Black et al., 1997; Buxbaum et al., 1998). Letzteres wird durch γ -Sekretasen weiter gespalten, und es entsteht die P-Komponente (P3) des Amyloids (*Abb. 3, A*). Darüber hinaus gibt es einen **alternativen Abbauweg**, in dem das APP durch eine β -Sekretase (Haass et al., 1992; Seubert et al., 1992, 1993) in ein lösliches extrazelluläres APP-Fragment (sAPP- β) und ein membranständiges Stück (C99) mit freiem NH₂-Ende gespalten wird (*Abb. 3, B*). Aus diesem transmembranösen Protein wird vermutlich durch die γ -Sekretase in Endosomen oder Lysosomen unterschiedlicher intraneuronaler Kompartimente (ER und Golgi-Apparat) das COOH-Ende generiert und das amyloidogene β A4-Protein nach transzellulärer Passage freigesetzt (Younkin, 1991; Ferreira et al., 1993; Discroll, 1994; Hartmann et al., 1997). Im extrazellulären Raum aggregiert β A4-Protein zu Amyloidfibrillen. Die Enzyme sind bis heute nicht eindeutig identifiziert; es werden sowohl membrangebundene als auch endosomale Se-

kretasen (Metalloproteasen) vermutet (Backstrom et al., 1996; Carvalho et al., 1997; Mok et al., 1997; Selkoe, 1999).

Versuche mit radioaktiv markiertem APP konnten einen endozytotischen Weg des APP-Metabolismus aufzeigen (Koo et al., 1994). Nach endosomaler Internalisierung des markierten APPs wurde nach ca. 30 Minuten β A4-Protein von den Zellen in Kultur freigesetzt, das nur von den markierten membranständigen Oberflächenproteinen abstammen konnte. Die enzymatische Spaltung entweder auf Höhe der Aminosäure 711 oder 713 erzeugt zwei unterschiedliche Peptide, β A4(40)- und β A4(42)-Protein (Fukumoto et al., 1996; Hartmann et al., 1997; Wiltfang et al., 1997). Die Variabilität des COOH-Endes bedingt unterschiedliche Löslichkeiten des β A4-Proteins. Das längere β A4(42)-Protein findet sich bevorzugt in den diffusen Plaques im Neuropil und ist die initial abgelagerte Form in Gefäßen (Shinkai et al., 1995), während das kürzere β A4(40)-Protein in neuritischen Plaques auftritt (Iwatsubo et al., 1994; Fukumoto et al., 1996). *In vitro* Untersuchungen machten deutlich, daß β A4(42)-Protein aufgrund zweier zusätzlicher hydrophober Gruppen sehr viel schneller zu Amyloidfibrillen aggregiert als das β A4(40)-Protein (Jarret et al., 1993).

Es existieren verschiedene Theorien der vaskulären, neuronalen und anderer zellulärer Genese des β A4-Proteins. Für einen **hämatogenen Ursprung** spricht das im Blut auf der Oberfläche von Thrombozyten (Simons et al., 1998) und Lymphozyten (Suh et al., 1997) vorhandene Amyloidvorläuferprotein (APP). Glenner et al. (1981) postulieren, daß das β A4-Protein ebenso wie die Serumbestandteile (Komplementfaktoren, Immunglobuline, α -1-Antichymotrypsin), die in Vergesellschaftung mit Plaques nachgewiesen wurden (Beyreuther und Masters, 1991), nach proteolytischer Abspaltung aus APP auf Gehirndothelzellen, durch eine vorgeschädigte Blut-Hirn-Schranke in das ZNS gelangen könnte.

Die APP-Expression auf Neuronen, das laminäre Verteilungsmuster der Plaques in der grauen Substanz und das Auftreten von nicht gefäßassoziierten β A4-Proteinablagerungen sprechen für einen **neuronalen Ursprung** (Beyreuther und Masters, 1991; Griffin et al., 1994). Yamaguchi et al. (1989, 1990) postulieren, daß Schäden an den Präsynapsen der Neuriten einer β A4-Proteinkondensation vorangehen.

Auch **Mikrogliazellen** exprimieren das APP (Masters et al., 1985a; Griffin et al., 1998). Doppelmarkierungsversuche bestätigten, daß die Plaques des Menschen in Abhängigkeit von ihrer Form eine geringe oder hohe Anzahl aktivierter Mikrogliazellen aufweisen (Haga et al., 1989; Banati et al., 1994; Griffin et al., 1995; Fukumoto et al., 1996; Sasaki et al., 1997; Sheng et al., 1997a und b; Overmyer et al., 1999), die Zytokine, wie z.B. IL-1 (Dickson et al., 1991b; Mc Geer et al., 1994; Griffin et al., 1994, 1995, 1998), IL-6 (Mc Geer et al., 1994; Hüll et al.,

1995, 1996), Akute-Phase-Proteine (Haga et al., 1989; Kalaria, 1993a; Aisen et al., 1995) und Anteile des Komplementsystems (McGeer et al., 1994; Eikelenboom et al., 1996) synthetisieren, die möglicherweise im Rahmen eines chronischen Entzündungsprozesses die Plaque-entstehung und -kondensation vorantreiben.

Mikrogliazellen, erstmals von Del Rio-Hortega 1919 (Del Rio-Hortega, 1919) beschrieben, stammen möglicherweise von im Blut zirkulierenden Monozyten ab, die im Verlauf der Gehirnentwicklung einwandern oder aber stellen neuroektodermale Zellen dar, die phagozytieren können (Dickson et al., 1991b; Ling et al., 1993). Sie liegen sowohl in der grauen als auch der weißen Substanz und weisen im Aktivierungszustand eine veränderte Morphologie und eine verstärkte MHC Klasse II-Expression auf (Banati et al., 1994; Dickson et al., 1991b). Mikrogliazellen verfügen auf ihrer Oberfläche über "fragment of cristallization"(Fc)-Rezeptoren (Banati et al., 1994), "class A scavenger receptor"- (El Khoury et al., 1996) und "advanced glycation endproduct"(AGE)-Rezeptoren (Yan et al., 1996, 1997), mit denen sie an das β A4-Protein binden können. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten, daß sich die Mikrogliazellen direkt an β A4-Proteinfibrillen anlagern können und daß sich diese im endoplasmatischen Retikulum (Wisniewski et al., 1989; Perlmuter, 1990) und in zytoplasmatischen Einstülpungen von Mikrogliazellen finden (Roher et al., 1988). An Plaques gebundene Mikrogliazellen synthetisieren IL-1, IL-6 und TNF- α , setzen NO-Verbindungen und reaktive Sauerstoffspezies frei (Dickson et al., 1991; Mc Geer et al., 1994; Griffin et al., 1998; Markesbery et al., 1999). Mikrogliazellen finden sich sehr zahlreich in Gehirnen von Alzheimer-Patienten, die ApoE ϵ 4 homozygot aufweisen (Egensperger et al., 1998).

Neben den Mikrogliazellen werden auch **Astrozyten** aktiviert, die β A4-Protein phagozytieren (Funato et al., 1998; Griffin et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998) und so möglicherweise eine überschießende Mikrogliazellreaktion bremsen (De Witt et al., 1998).

Eine **Neuronendegeneration** wird entweder direkt durch das neurotoxische Potential des in β -Faltblattstruktur vorliegenden β A4-Proteins selbst oder aber indirekt durch die induzierte chronische Entzündung ausgelöst. Der Aggregationszustand des β A4-Proteins bedingt seine Neurotoxizität (Lorenzo et al., 1994; Behl et al., 1997). Kofaktoren, wie z. B. ApoE lösen eine beschleunigte β -Faltblattstrukturbildung aus (Ma et al., 1994). Es wird postuliert, daß β A4-Protein in fibrillärer Form neurotoxisch und in nicht-fibrillärer Form neurotrop ist (Pike et al., 1993 und 1995). *In vitro* und *in vivo* löst β A4-Protein neuronale Apoptosen aus (Forloni et al., 1996; Li et al., 1997). Im Rahmen der zellulären Reaktionen führen erhöhte APP- und IL-1-Expression indirekt durch freigesetzte Stickoxide (NO) und reaktive Sauerstoffspezies (Superoxid-Radikal-Anion, Hydroxyl-Radikal) zu Neuronenschäden (Griffin et al., 1998;

Markesbery et al., 1999), die sich durch einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom nach Öffnung nicht-selektiver Ionenkanäle (Furukawa et al., 1994; Brown et al., 1997), eine verminderte Acetylcholin- (Francis et al., 1993; Kelly et al., 1996; Roberson et al., 1996) und Glutamatfreisetzung (Hyman et al., 1987; Ossowska et al., 1993) und einen Verlust von Synapsen (Terry et al., 1991; Samuel et al., 1994) auszeichnen.

2.2.3 Kognitive Dysfunktion und Verhaltensänderungen des alten Hundes

In Studien über Alterungsvorgänge beim Hund wurde deutlich, daß es hinsichtlich der Alters- und Rassenverteilung in einer Hundepopulation große Unterschiede gibt. Innerhalb der Hundepopulation in Deutschland überwiegt zahlenmäßig eindeutig der Mischlingshund (Danckert und Kraft, 1997; Kraft, 1997; Michell, 1999). Die Hunde lassen sich in kleinwüchsige, mittelgroße und große Tiere einteilen, wobei die Grenzen bei ca. 15 und 45 kg liegen. Das durchschnittliche Sterbealter der Tiere beträgt 10 Jahre; kleine Hunde werden älter als mittelgroße oder große Hunde (Michell, 1999). Die mittlere Lebenserwartung beträgt bei kleinen Hunden 11 Jahre, bei Hunden mittlerer Größe 10 Jahre und bei sehr großen Hunden 7 Jahre. Ausnahmen stellen der Münsterländer mit einer mittleren Lebenserwartung von 14 Jahren und der Zwergpudel mit 13 bis 14 Jahren dar. Im Alter von 6 bis 9 Jahren weisen Hunde eine Zunahme von Krankheiten auf. Der Beginn des „geriatriischen Lebensabschnitts“ wird für den Hund in der Literatur auf die Zeit zwischen dem 7. und 11. Lebensjahr festgelegt (Danckert und Kraft, 1997), und nur ca. 8% aller Hunde werden älter als 15 Jahre (Michell, 1999).

Bisherige Untersuchungen über altersabhängige kognitive Dysfunktionen bzw. Verhaltensänderungen in Korrelation zu morphologischen Veränderungen im Gehirn wurden unter anderem im Rahmen von Wirksamkeitsstudien von L-Deprenyl (Selegilin[®]) an Hunden durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Besitzerbefragungen zum mentalen Status der alten Tiere vorgenommen (Ruehl et al. 1994, 1995, 1997, 1998). Die Tierbesitzer beschrieben Veränderungen im Verhalten ihrer Tiere, wie z.B. eine Abnahme der Aktivität und der Aufmerksamkeit gegenüber dem Besitzer und anderen Hunden. Weiterhin zeigten die Hunde häufig Zustände der Desorientierung, zielloses Herumwandern, nächtliche Unruhe und ein gesteigertes Schlafbedürfnis am Tag sowie Harn- und Kotinkontinenz. Kontrollierte Verhaltensstudien an teilweise trainierten Hundepopulationen nahmen Cummings et al. (1993, 1996a) und Head et al. (1992, 1995, 1996, 1997, 1998) vor und postulierten ein Defizit des Kurzzeitgedächtnisses und ein insgesamt schlechteres Bestehen im Rahmen von Lerntests bei Hunden mit einer großen Plaqueanzahl im Gehirn. Andere Untersuchungen heben hervor, daß es hinsichtlich der Verschlechterung des kognitiven Status Unterschiede zwischen den

Hunderassen gibt (Milgram et al., 1995). Head et al. (1995) finden sowohl alte „demente“ Hunde als auch alte unauffällige Hunde. Head et al. (1998) konnten ansatzweise zeigen, daß das topographische Verteilungsmuster der Plaques im Hundehirn Einfluß auf Ausfallserscheinungen, wie z.B. ein schlechteres Kurzzeitgedächtnis, hat. Ferrer et al. (1993) bringen dagegen degenerative Veränderungen in der weißen Substanz des Großhirns, die sich durch eine Zunahme Ubiquitin-positiver Granula zwischen den Myelinscheiden auszeichnet, ursächlich mit Verhaltensänderung alter Hunde (Desorientierung, Inkontinenz) in Verbindung.

2.2.4 Plaques im Hundehirn

Mittels immunhistologischer Untersuchungen konnten β A4-Protein-positive **Plaques** im Gehirn alter Hunde nachgewiesen werden (Giaccone et al., 1990; Uchida et al., 1990, 1991, 1992a und b, 1993, 1997; Shimada et al., 1991, 1992; Russel et al., 1992, 1996; Cummings et al., 1993, 1996a und b; Head et al., 1995, 1998; Wegiel et al., 1995, 1996; Yoshino et al., 1996; Geisel et al., 1997; Borrás et al., 1999). Cummings et al. (1996a und b) fanden bei über der Hälfte von 100 untersuchten Hunden, die älter als 10 Jahre waren, Plaques. Die Plaques des Hundes sind meist größer als die des Menschen (Giaccone et al., 1990; Cummings et al., 1993; Cummings et al., 1996a) und weisen eine den diffusen Plaques des Menschen ähnliche Morphologie auf (Giaccone et al., 1990; Russel et al., 1992; Uchida et al., 1992a und b, 1993; Cummings et al., 1993, 1996a und b; Okuda et al., 1994; Morys et al., 1994). Nur vereinzelt wurden kondensierte, den klassischen/neuritischen Plaques des Menschen morphologisch ähnliche Plaques beschrieben, die sich aus einzelnen aufgeblähten Neuriten und Kongorot-positiven Amyloidkomponenten zusammensetzen (Wisniewski et al., 1970; Pauli und Luginbühl, 1971; Russel et al., 1992; Shimada et al., 1991, 1992; Uchida et al., 1993). Andere Autoren konnten diese Plaqueform nicht finden (Giaccone et al., 1990; Cummings et al., 1993, 1996a und b; Russel et al., 1996; Wegiel et al., 1996). Erste Untersuchungen über die **topographische Verteilung** der Plaques im Hundehirn machten deutlich, daß sie am häufigsten im Kortex und nur sehr selten im Stammhirn und Kleinhirn zu finden sind (Shimada et al., 1991; Hou et al., 1997). Cummings et al. (1996) betrachteten bandartige, flächenhafte Signale im Stratum moleculare des Hippocampus als Hinweis auf intrazellulär abgelagertes β A4-Protein in angeschnittenen Nervenzellausläufern von Neuronen, die die sogenannte limbische Schleife bilden (Steward et al., 1976).

In den Plaques des Hundes finden sich überwiegend Ablagerungen des β A4(42)-Proteins (Cummings et al., 1996b; Tekirian et al., 1996; Wisniewski et al., 1996; Nakamura et al.,

1997), aber auch des β A4(40)-Proteins (Yoshino et al., 1996). Mittels Doppelmarkierungsversuchen konnten Uchida et al. (1993) zeigen, daß sich β A4-Protein in den Gehirngefäßen des Hundes in der Tunica media von Arteriolen und an der Basalmembran von Kapillaren ablagert. Uchida et al. (1991) beschreiben bei Hunden mit einer zerebrovaskulären Amyloidose auch Amyloidablagerungen in den Gefäßen des Dünndarms, des Herzens und in geringer Menge in anderen viszerale Organen. Diese Ablagerungen zeichnen sich durch eine gemeinsame Kongophilie aus, allerdings wurde eine Typisierung des Amyloids nicht durchgeführt.

2.2.5 Pathogenese der Plaques im Hundehirn

Das **Amyloidvorläuferprotein** (APP) wurde mittels Westernblot im Gehirn, den Meningen, der Zerebrospinalflüssigkeit und verschiedenen viszerale Organen des Hundes gefunden (Okuda et al., 1994). Mittels immunhistologischer Untersuchungen fand sich APP in den Membranen von Neuronen, Axonen und in Gefäßwänden (Kapillaren und Arteriolen; Okuda et al., 1994; Nakamura et al., 1997). Darüber hinaus exprimieren die in den wenigen klassischen Plaques des Hundes beschriebenen Neuriten APP (Shimada et al., 1991, 1992; Uchida et al., 1993; Okuda et al., 1994; Nakamura et al., 1997).

Das kanine APP (105-120 kDa) entspricht dem des Menschen und des Affen (Martin et al., 1991, 1994; Okuda et al., 1994). Johnstone et al. (1991) konnten im Rahmen molekularbiologischer Studien zeigen, daß die Nukleinsäuresequenz des APP bei unterschiedlichen Spezies, so z.B. bei Menschen, Affen und Hunden, hoch konserviert ist. Ein Vergleich machte deutlich, daß bei Mensch, Hund, Polarbär und Affe nur stille Mutationen in der Nukleotidsequenz vorliegen, so daß die abgeleiteten Aminosäuresequenzen identisch sind. Mäuse und Ratten dagegen weisen drei ausgetauschte Aminosäuren auf und zeigten deshalb keine spontanen β A4-Proteinablagerungen im Gehirn (Johnstone et al., 1991). Außer β A4-Protein wurden in kondensierten Plaques des Hundes weitere Komponenten gefunden: Apolipoprotein E, Cathepsin D, Cystatin C, α -1-Antichymotrypsin und Ubiquitin (Uchida et al., 1997).

Es gibt unterschiedliche Theorien über den Ursprung des β -Amyloids im Hundehirn. Uchida et al. (1993) und Shimada et al. (1992, 1993) weisen aufgrund der oft engen räumlichen Kolokalisation der Plaques mit Arteriolen und Kapillaren auf einen **hämatogenen Ursprungsort** hin. 1976 postulierten Dahme und Sprengler im Rahmen von ultrastrukturellen Untersuchungen, daß möglicherweise die Myozyten der Gefäße Bildungsort des β A4-Proteins sein könnten. Prior et al. (1995) gelang die Kultivierung von kaninen leptomenigealen Gefäßen, bei denen nach Zugabe von β A4(40)-Protein in das Kulturmedium eine Zeit- und Dosisabhängige Bindung dieses Proteins an die Tunica media und Tunica adventitia von Gefäßen

mit präexistentem β A4-Protein auftrat. Frackowiak et al. (1995) konnten bei alten und jungen Hunden ohne präexistente β A4-Proteinablagerungen nachweisen, daß glatte Muskelzellen intrazellulär β A4-Protein bilden können. Ultrastrukturelle Studien bestätigten, daß sich bei Hunden mit einer kongophilen Angiopathie lösliches β A4-Protein in den glatten Muskelzellen fand, welches sich an der Basalmembran niederschlug (Wegiel et al., 1995). Möglicherweise wird β A4-Protein im Neuropil und in Gefäßen abgelagert, aber nur in Gefäßen weiter in eine β -Faltblattstruktur umgeformt (Giaccone et al., 1990). Für einen **neuronalen Ursprung** des β A4-Proteins spricht die räumliche Kolo-kalisation der Plaques mit Neuronen (Wisniewski et al., 1970; Cummings et al., 1993, 1996a und b), die APP exprimieren (Okuda et al., 1994).

Über **Plaque-assoziierte Zellreaktionen** gibt es im Hundehirn bisher kaum Untersuchungen. Borrás et al. (1999) sowie Shimada et al. (1992) beschreiben in den Gehirnen alter Hunde eine Astroglie, ohne näher auf mögliche Interaktionen mit den Plaques einzugehen. Uchida et al. (1993) fanden in der Nähe der Plaques keine Astroglie, wohingegen Nakamura et al. (1997) reaktive Astrozyten um Plaques herum angeordnet fanden. Russel et al. (1992) untersuchten die Gehirne von Beagles, die unter gleichen Bedingungen lebten (Langzeitlaborstudie) und deren Abstammung bekannt war. Die Tiere einer Familie wiesen alle hohe oder niedrige Plaquezahlen auf. Dies weist auf mögliche genetische Faktoren innerhalb der Hundepopulation hin, die eine Prädisposition für das Auftreten von Plaques bedingen und bisher unbekannt sind. Wegiel et al. (1996) beschreiben sowohl Hunde mit einer sehr geringen als auch Hunde mit einer sehr hohen Plaquedichte im Gehirn, ohne daß mögliche Ursachen genannt werden. Bisher gab es nur von Yoshino et al. (1996) den Hinweis, daß möglicherweise Plaques bevorzugt bei Hunden auftreten, die maligne Tumoren haben.

Inwieweit die Plaques im Hundehirn zu einer **Neuronendegeneration** und Neuronenverlusten führen, ist bisher unklar. Die Plaques im Kortex umschließen häufig die Neuronen, ohne daß bei diesen eine veränderte Morphologie im Sinne einer Degeneration auffällt (Cummings et al., 1993, 1996b; Russel et al., 1993). Wisniewski et al. (1970) fanden im Rahmen von ultrastrukturellen Untersuchungen, daß sich in den diffusen Plaques von Hunden kaum β -Faltblattfibrillen ausbilden. Cummings et al. (1996b) postulieren, daß die Plaques aufgrund der nicht vorhandenen β -Faltblattstruktur des β A4-Proteins nicht direkt neurotoxisch sind und nicht zum Absterben der Neuronen führen. Es ist bisher unklar, ob durch die Plaques Synapsenschäden, eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase oder Veränderungen an Acetylcholin- oder Glutamatrezeptoren hervorgerufen werden, die die kognitiven Dysfunktionen bei Hunden mit zahlreichen Plaques erklären könnten (Cummings et al., 1996a

und b). Ball et al. (1983) weisen bei alten Hunden keinen Neuronenverlust im Kortex nach; Morys et al. (1994) stellten nur bei Hunden, die älter als 17 Jahre waren, eine Abnahme der Neuronenzahl im Claustrum fest. Dagegen steigt die Anzahl apoptotischer (TUNEL-positiver) Zellen im Gehirn von Hunden mit zunehmendem Alter an, unabhängig davon, ob und wieviele Plaques vorliegen, und es findet sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl apoptotischer Zellen und dem Grad der „Demenz“ des Hundes (Kiatipattanasakul et al., 1996).

2.3 Senile Plaques und neurofibrilläre Bündel im Gehirn verschiedener Tierspezies

Plaques konnten in den Gehirnen alter **Affen** (Cork et al., 1987, 1990; Bachevalier et al., 1991; Price et al., 1987, 1991; Martin et al., 1994; Uno et al., 1996; Nakamura et al., 1996a und b; Härtig et al., 1997; Sloane et al., 1997; Walker et al., 1990, 1997) ebenso wie das APP nachgewiesen werden. Die cDNA des APP von Affen ist mit der humanen Sequenz identisch (Johnstone et al., 1991; Podlinsky et al., 1991), und APP wurde in Neuronen und in dystrophischen Neuriten in und um Plaques nachgewiesen (Martin et al., 1991; Price et al., 1991).

Plaques treten bei Rhesusaffen ab einem Alter von 23 Jahren auf (Cork et al., 1987) und lassen sich mit einem Defizit im Rahmen kognitiver Tests und einem Verlust des Kurzzeitgedächtnisses korrelieren (Cork et al., 1987; Price et al., 1987, 1991; Bachevalier et al., 1991). Die Plaques, überwiegend diffuse und nur wenige neuritische Formen (Sloane et al., 1997), treten zahlreich im frontalen und temporalen Kortex, selten im entorhinalen Kortex und dem Hippocampus auf (Martin et al., 1994). Allerdings gibt es hinsichtlich der Verteilungsmuster und des Schweregrads der Läsionen individuelle Unterschiede bei Tieren gleichen Alters (Bachevalier et al., 1991; Price et al., 1991; Sloane et al., 1997). In den neuritischen Plaques wurden ApoE (Nakamura et al., 1996a, Härtig et al., 1997), α -1-Antichymotrypsin, Anteile des Komplementsystems (Cork et al., 1990; Podlinsky et al., 1991; Nakamura et al., 1996b), aktivierte Mikrogliazellen sowie einige Astrozyten (Härtig et al., 1994, 1997) nachgewiesen. Eine kongophile Angiopathie konnte bei alten Rhesusaffen regelmäßig nachgewiesen werden (Cork et al., 1990; Podlinsky et al., 1991; Price et al., 1991; Uno et al., 1996). Neurofibrilläre Bündel traten nicht auf (Martin et al., 1994, Uno et al., 1996; Härtig et al., 1997; Sloane et al., 1997). Alte Totenkopffaffen (Squirrel monkeys) zeigen nur selten Plaques. Sie entwickeln aber eine hochgradige kongophile Angiopathie (Walker et al., 1990; Price et al., 1991; Levy et al., 1995; Mackic et al., 1998), die die Gefäße des Großhirns, des Mandelkerns und des

Septums und einige Gefäße der weißen Substanz und des Kleinhirns betreffen (Walker et al., 1997). Totenkopffaffen werden als Tiermodell für die kongophile Angiopathie des Menschen herangezogen (Levy et al., 1995). Plaques wurden weiterhin in den Gehirnen von alten Orang-Utans (Gearing et al., 1997), alten Schimpansen (Gearing et al., 1994) und Lemuren (Bons et al., 1992) beschrieben.

Neben Affen und Hunden finden sich Plaques auch im Gehirn alter **Bären**, wie z.B. eines Schwarzbären (*Euarctos ursus americanus*) und eines Polarbären (*Ursus maritimus*; Cork et al., 1988; Uchida et al., 1995). Im Gehirn des Schwarzbären liegen darüber hinaus gefäßassoziierte β A4-Proteinablagerungen vor. Diffuse Plaques (Kongorot-negativ) fanden sich im Kortex, im Hippocampus und überraschenderweise in der Molekularschicht des Kleinhirns. Dies stellt im Vergleich zu allen anderen Tierspezies, die Plaques entwickeln, eine Ausnahme dar. Diffuse Plaques werden sonst nur im Kleinhirn bei Menschen mit der Alzheimer-Krankheit beschrieben. Es konnten weiterhin neben diffusen Plaques stärker kondensierte, Kongorot-positive Plaques im frontalen Kortex dargestellt werden. Bei einem Schwarzbären (Uchida et al., 1995) sowie im Gehirn eines Polarbärs (Cork et al., 1988) lagen keine neurofibrillären Bündel vor. Im Gegensatz hierzu zeigten Cork et al. (1988), die insgesamt 5 Bären untersuchten, neurofibrilläre Bündel (10-16 nm breite Fibrillen) im Gehirn eines asiatischen Braunbären (*Ursus arctos*) in Neuronen des Hippocampus, des entorhinalen Kortex und des Mandelkerns (Nucleus amygdaloideum) mittels Immunhistologie und Silberfärbung. Diffuse Plaques fanden sich bei diesem Tier nicht. Alte Himalaya-Schwarzbären (*Ursus thibetanus*) und Kodiak-Bären (*Ursus arctos*) wiesen weder Plaques noch neurofibrilläre Bündel auf.

Roertgen et al. (1996) beschreiben Plaques (diffuse und neuritische), eine kongophile Angiopathie sowie damit einhergehende Hirnblutungen und neurofibrilläre Bündel im Gehirn eines alten **Vielfraßes** (*Gulo gulo*).

Nakamura et al. (1996c) untersuchten sehr alte **Katzen** und fanden bei Tieren über 18 Jahren β A4-Protein im Neuropil in Form kleiner granulärer Strukturen, die häufig in der Nähe von Neuronen und Gefäßen lagen. Diese Ablagerungen sind allerdings viel dezenter als zum Beispiel beim Hund und ähneln nicht den Plaques des Menschen.

Die Beobachtung von Plaques in der Großhirnrinde eines über 20 Jahre alten **Kamels** (*Camelus bactrianus*) von Nakamura et al. (1995) stellt bisher die einzige Beschreibung von Plaques im Gehirn eines Pflanzenfressers (Herbivoren) dar. Neurofibrilläre Bündel fanden sich nicht. Trotz der Annahme von Johnstone et al. (1991), daß Kühe aufgrund der Homologie ihrer β A4-Proteinsequenz mit der des Menschen Plaques entwickeln können, gibt es bisher keinen Hinweis auf die Entstehung von Plaques im Gehirn von Kühen.

Braak et al. (1994) fanden hyperphosphoryliertes Tau-Protein in Neuronen der Großhirnrinde (Lobus piriformis) von **Schafen** und **Ziegen** (älter als 10 Jahre), das aber keine Kondensation zu neurofibrillären Bündeln aufwies. Dagegen wurden bei 10 Jahre alten Schafen neuritische Plaques, neurofibrilläre Bündel und Neuropilfäden überwiegend im Lobus piriformis von Nelson et al. (1994, 1995) nachgewiesen.

Nakayama et al. (1999) beschrieben hochgradige Amyloidablagerungen in Gehirngefäßen eines **Spechtes** (*Picoides major*) und wenige Plaque-ähnliche β A4-Proteinablagerungen im Neuropil. Das Amyloidvorläuferprotein und β A4-Protein konnten immunhistologisch in den Gehirnen alter **Lachse** nachgewiesen werden (Maldonado et al., 2000).

Aus **Schweinegehirnen** konnte APP in löslicher und membrangebundener Form isoliert werden, Plaques fanden sich jedoch nicht (de la Fourniere-Bessueille et al., 1997). Ebenso ließ sich APP aus der extrazellulären Matrix von Hühnerembryogehirnen isolieren, das hier möglicherweise an der Neuronenentwicklung beteiligt ist (Small et al., 1992).

Eine hochgradige APP-Expression findet sich, möglicherweise als wichtiger Faktor in der Gehirnreifung und der Synapsenexpression, im Verlauf der zweiten postnatalen Woche in Rattegehirnen (Löffler et al., 1992). Adulte **Ratten** weisen diese hochgradige APP-Expression nur noch in Neuronen des Riechkolbens auf (kontinuierliche Synaptogenese) (Löffler et al., 1992). APP findet sich weiterhin in Neuronen, Gefäßen, Meninge, Plexus chorioideus und Ependymzellen (Coria et al., 1992). Alte Ratten zeigen schließlich eine Anhäufung des APPs im Zellkörper und den Dendriten von Purkinjezellen (Nakamura et al., 1994). Spontane β A4-Proteinablagerungen aber kommen bei Ratten nicht vor, es sei denn, es handelt sich um transgene Tiere, die eine Überexpression oder Mutation eines der "causative gens" (APP, PS1, PS2) für die familiäre Alzheimer-Krankheit aufwiesen (Chen et al., 1998).

3 Material und Methoden

3.1 Hunde

Zur Untersuchung lagen insgesamt 138 **Hunde** im Alter von 1 Monat bis zu 18 Jahren vor. Sektionstagebuchnummer, Alter, Geschlecht, Rasse und Erkrankungs- bzw. Todesursache der Tiere sind in *Tab. 4* (Anhang 9.4) zusammengefaßt. Die Hunde stammen aus dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie in Giessen und aus tierärztlichen Praxen in Hessen und angrenzenden Bundesländern. Alle Hunde wurden immunhistologisch auf β A4-Proteinablagerungen untersucht. Die für weitere Untersuchungen ausgewählten Tiere sind in *Tab. 4* (Anhang 9.4) durch Fettdruck hervorgehoben. Für den Methodenvergleich wurden 30 alte Hunde (Gruppe 3: Nr. 49, 50, 57, 63, 67, 70, 71, 78, 79, 82, 86, 87, 88, 92, 95, 96, 98, 101, 102, 104, 105, 112, 115, 116, 117, 120, 121, 123, 127, 129, *Tab. 4*, 10-18 Jahre) herangezogen. Für die immunhistologische Markierung des Amyloidvorläuferproteins ("amyloid precursor protein", APP), Neurofilament (NF)-positiver Axone und Sphäroide, des Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC Klasse II)-Antigens und des Lektins *Bandeiraea simplicifolia* (BS-1) auf aktivierten Mikrogliazellen, des sauren Gliafaserproteins (GFAP) in Astrozyten, Vimentin (Vim)-positiver Zellen, pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α) und TUNEL-positiver Zellen wurden von den 138 Hunden insgesamt 40 Tiere ausgewählt, die in drei Gruppen unterteilt wurden. Die **Gruppe 1** bestand aus fünf jungen Hunden (Nr. 17, 18, 19, 20, 22, *Tab. 4*, 2-3 Jahre). Die **Gruppe 2** setzte sich aus fünf alten Hunden (Nr. 56, 91, 99, 106, 109, *Tab. 4*, 11-14 Jahre), die keine Plaques aufwiesen, zusammen. Die **Gruppe 3** bestand aus 30 alten Hunden (Nr. 49, 50, 57, 63, 67, 70, 71, 78, 79, 82, 86, 87, 88, 92, 95, 96, 98, 101, 102, 104, 105, 112, 115, 116, 117, 120, 121, 123, 127, 129, *Tab. 4*, 10-18 Jahre), die Plaques in unterschiedlicher Anzahl aufwiesen. Für die immunhistologischen Untersuchungen zur Darstellung der MHC Klasse II-Antigen Expression auf aktivierten Mikrogliazellen in Gefrierschnitten wurden die Gehirne von 8 jungen Hunden (Nr. 131-138, *Tab. 4*, 9 Monate), die aus Kontrollgruppen von Toxizitätsstudien stammten herangezogen. Darüber hinaus wurde der Versuch unternommen mittels eines selbsterstellten **Fragebogens** (Anhang 9.4), der an die behandelnden Tierärzte und die Tierbesitzer ausgegeben wurde, anamnestische Daten über Verhaltensänderungen bzw. das Vorliegen einer kognitiven Dysfunktion bei alten Hunden zu erhalten.

3.2 Organproben für Histologie, Histochemie und Immunhistologie

3.2.1 Herstellung der Paraffinblöcke

Von allen Tieren wurde während der Sektion das Gehirn entnommen und in 10%igem Formalin für 10 Tage fixiert. Das Gehirn wurde in 8 Schnittebenen, in Anlehnung an den Atlas "The brain of the dog in section" von M. Singer [1962, Schnittebene Nr.1 (53), Nr. 2 (49), Nr. 3 (45), Nr. 4 (42), Nr. 5 (35), Nr. 6 (32), Nr. 7 (28), Nr. 8 (14)] aufgearbeitet (*Abb. 4*). Weiterhin wurden Gewebeproben aus Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Nebenniere und Dünndarm sowie ein Auge und Proben aus pathologisch-anatomisch veränderten Organen entnommen. Nach der Fixationszeit von 10 Tagen erfolgte nach einer Entwässerung der Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe eine maschinelle Einbettung bei 58°C in einem Paraffin-Paraplast®-Gemisch. Es wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte für die Immunhistologie und für die Histochemie hergestellt und einzeln auf SuperFrost/Plus-Objektträger (Menzel Gläser®) aufgezogen. Ein Schnitt pro Block wurde auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

3.2.2 Herstellung der Gefrierblöcke

Für die Gefrierblockherstellung wurde wie von Wünschmann (1998) beschrieben eine ca. 5 mm dicke Scheibe aus dem Großhirn mit parietalem und temporalem Kortex sowie Hippocampus (Schnittebene 35 nach Singer, 1962) entnommen und drei Gewebestücke mit ca. 8 mm Kantenlänge in je ein Aluminiumhütchen gelegt, mit Tissue-Tec® O.C.T. (Vogel GmbH & Co KG) bedeckt und in Isopentan (Fluka Chemie AG), das durch flüssigen Stickstoff in einer umgebenden Kammer auf seinen Gefrierpunkt gekühlt wurde, schockgefroren. Die drei Gefrierblöcke enthielten folgende Lokalisationen: Block Nr. 1: parietaler Kortex mit Gyrus cinguli, splenialis, suprasplenialis, lateralis, Block Nr. 2: Hippocampus und Block Nr. 3: temporaler Kortex mit Gyrus ectosylvius posterior. 10 µm dicke Schnitte wurden auf einem Kryotom der Firma Reichert-Jung (Frigocut, Modell 2700) angefertigt, auf SuperFrost/Plus®-Objektträger (Menzel Gläser, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG) aufgezogen, 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur in Aceton fixiert. Die Gefrierblöcke und die Schnitte wurden bis zur Weiterbearbeitung bei -70°C gelagert.

3.2.3 Untersuchte Gehirnregionen

Alle 8 Schnittebenen wurden in der HE-Färbung pathologisch-histologisch untersucht. Zwei Großhirnschnitte pro Gehirn, einer auf Höhe des Nucleus caudatus (Schnittebene Nr. 2) und der zweite auf Höhe des Hippocampus mit parietalem und temporalem Kortex (Schnittebene Nr. 5) von 30 alten Hunden (Nr. 49, 50, 57, 63, 67, 70, 71, 78, 79, 82, 86, 87, 88, 92, 95, 96, 98, 101, 102, 104, 105, 112, 115, 116, 117, 120, 121, 123, 127, 129, *Tab. 4*, 10-18 Jahre) wurden für den Methodenvergleich (Histochemie/Immunhistologie) mit fünf Versilberungstechniken und der Immunhistologie untersucht. Eine Großhirnebene (Schnittebene Nr. 5) wurde bei allen Hunden (Nr. 1-130, *Tab. 4*, 1 Monat bis 18 Jahre) immunhistologisch auf β A4-Proteinablagerungen untersucht. Die Gehirne von 12 Hunden (Nr. 64, 70, 71, 88, 95, 98, 114, 115, 117, 129, *Tab. 4*, 12-18 Jahre) wurden in acht Schnittebenen [Nr.1 (53), Nr. 2 (49), Nr. 3 (45), Nr. 4 (42), Nr. 5 (35), Nr. 6 (32), Nr. 7 (28), Nr. 8 (14) nach Singer, 1962] immunhistologisch gefärbt, um die regionale Verteilung der Plaques im Gesamtgehirn darzustellen (*Abb. 4*). Zur immunhistologischen Untersuchung der Verteilung des Amyloidvorläuferproteins, von GFAP-, MHC Klasse II-, BS-1-, Vimentin-positiven Zellen, einer Neurofilament- und Zytokinexpression und für den *in situ*-Nachweis apoptotischer Zellen bzw. von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde die Schnittebene Nr. 5 von fünf jungen Hunden (Gruppe 1, Nr. 17, 18, 19, 20, 22, *Tab. 4*, 2-3 Jahre), fünf alten Hunden ohne Plaques (Gruppe 2, Nr. 56, 91, 99, 106, 109, *Tab. 4*, 11-14 Jahre) und 30 alten Hunde mit Plaques (Gruppe 3, Nr. 49, 50, 57, 63, 67, 70, 71, 78, 79, 82, 86, 87, 88, 92, 95, 96, 98, 101, 102, 104, 105, 112, 115, 116, 117, 120, 121, 123, 127, 129, *Tab. 4*, 10-18 Jahre) herangezogen. Die Doppelmarkierung (Plaques/Astrozyten) erfolgte in der Schnittebene Nr. 5 bei neuen Hunden aus der Gruppe 3 (Nr. 64, 78, 79, 88, 92, 95, 116, 117, 121, *Tab. 4*, 12-16 Jahre). Für die Untersuchung der MHC Klasse II-positiver Mikrogliazellen lag von 12 Hunden aus der Gruppe 3 (Nr. 67, 71, 92, 98, 105, 112, 115, 117, 121, 123, 127, 129, *Tab. 4*) Gefriermaterial vor, von dem Block Nr. 1 herangezogen wurde.

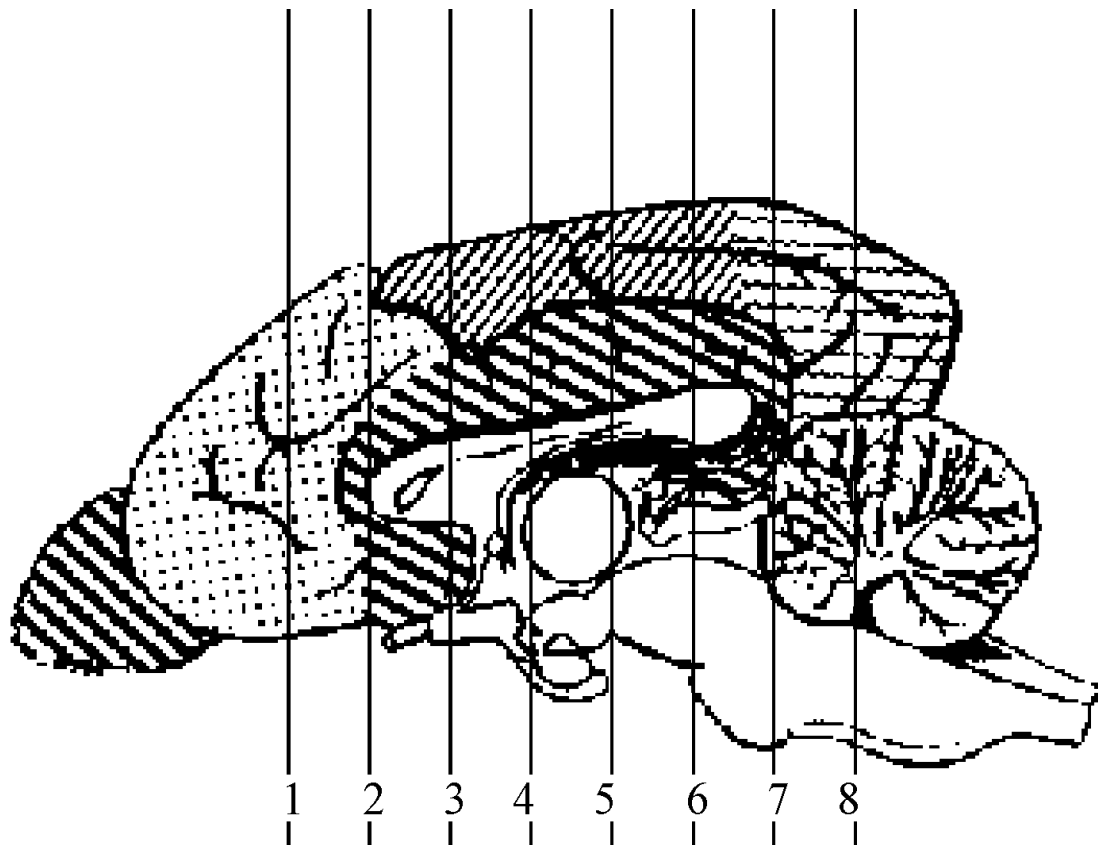


Abbildung 4: Schematische Darstellung der acht Schnittebenen in Anlehnung an den Atlas "The brain of the dog in section" von M. Singer, 1962. Schematische Gehirnabbildung aus Nickel-Schummer-Seiferle, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 4, Nervensystem. Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1975 entnommen.

In den Gewebeschnitten dieser Hunde wurden folgende **Gehirnregionen** in die Untersuchungen miteinbezogen:

Schnittebene Nr. 1: Lobus frontalis

Schnittebene Nr. 2: Lobus frontalis, Nucleus caudatus

Schnittebene Nr. 3: Lobus parietalis, temporalis, Putamen, Claustrum

Schnittebene Nr. 4: Lobus parietalis, temporalis, Thalamus

Schnittebene Nr. 5: Lobus parietalis, temporalis, Corpus geniculatum laterale und mediale, Hippocampus

Schnittebene Nr. 6: Lobus occipitalis

Schnittebene Nr. 7: Lobus occipitalis, Colliculi inferior

Schnittebene Nr. 8: Cerebellum

Die Einteilung und Nomenklatur erfolgte nach dem Atlas "The brain of the dog in section" nach M. Singer (1962).

3.3 Histochemische Färbeverfahren

Die Hämatoxylin und Eosin (HE) Übersichtsfärbung erfolgte routinemäßig in einem Färbeautomaten (Shandon Varistain 24-3). Für den Nachweis von Plaques (β A4-Protein) wurden fünf verschiedene Silberfärbungen eingesetzt. Es wurden die Methode nach Campbell-Switzer (Campbell et al., 1987), Reusche (Rosenwald et al., 1993), Bielschowsky in Anlehnung an das von Yamamoto et al. (1986) modifizierte Protokoll und das Protokoll im Handbuch für Labormethoden (Laboratory Methods in Histotechnology, Kapitel 14, A. E. Downing, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C.), Bodian in Anlehnung an das von Kondoh et al. (1993) modifizierte Protokoll und die Methode nach Gallyas (Gallyas 1971, 1980, 1982a und b) eingesetzt. Weiterhin wurde die Kongorot-Färbung nach Puchtler (1962) verwandt.

3.3.1 Protokoll der Silberfärbung nach Campbell-Switzer

1. Entparaffinieren der Schnitte in Roti[®]-Histol dreimal für 10 Minuten, in Isopropylalkohol für 5 Minuten, in 96%igem und 70%igem Alkohol für je 5 Minuten.
2. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
3. Inkubation in der Silberfärbelösung (siehe Anhang) auf einem Rüttler für 40 Minuten.
4. Waschen in 0,5%iger Essigsäure dreimal für je 5 Minuten.
5. Inkubation der Schnitte in physikalischem Entwickler (siehe Anhang) für ca. 15 Minuten (Sichtkontrolle im Mikroskop).
6. Waschen in 0,5%iger Essigsäure dreimal für je 5 Minuten.
7. Fixierung in 1%iger Natriumthiosulfat-Pentahydratlösung für 5 Minuten.
8. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
9. Vergolden in 0,1%iger Goldchloridlösung für 5 Minuten bis die Schnitte in einen grauen Farbton umschlagen.
10. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
11. Fixieren in 1%iger Natriumthiosulfat-Pentahydratlösung für 5 Minuten.
12. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
13. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 50%iger, 70%iger, 80%iger und 96%iger Alkohol für je 3 Minuten und zweimal Isopropylalkohol für je 5 Minuten, zuletzt in Roti[®]-Histol dreimal für je 2 Minuten, anschließend 5 Minuten in Xylol und Eindecken mit Hilfe des Folieneindeckautomaten Tissue-Tek[®] (Vogel GmbH & Co KG).

3.3.2 Protokoll der Silberfärbung nach Reusche

1. Entparaffinieren der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.1).
2. Waschen der Schnitte in Aqua dest. für 5 Minuten.
3. Umrandung der Schnitte mittels eines hydrophoben Stifts (PAP-Pen®).
4. Auftragen der frisch angesetzten Silberlösung (siehe Anhang) mit einer Plastikpipette und Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 55 Minuten.
5. Schnitte aus der Kammer entnehmen, Färbelösung abgießen und Schnitte in Aqua dest. für 2 Minuten waschen.
6. Fixieren in 3%iger Natriumthiosulfat-Pentahydratlösung für 2 Minuten.
7. Wässern der Schnitte in fließendem Leitungswasser für 30 Minuten.
8. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.1) und Eindecken mit Hilfe des Folieneindeckautomaten Tissue-Tek® (Vogel GmbH & Co KG).

3.3.3 Protokoll der Silberfärbung nach Bielschowsky (modifiziert)

1. Entparaffinieren der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.1).
2. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
3. Inkubation in vorgewärmter 17%iger Silbernitratlösung für 15 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C.
4. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
5. Inkubation in einer ammoniakalischen Silbernitratlösung für 15 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C.
6. Waschen in 0,3%iger Ammoniaklösung für 3 Minuten.
7. Entwickeln in der ammoniakalischen Silberlösung unter Zugabe von 6 Tropfen der Entwicklerlösung (siehe Anhang) für ca. 15 Minuten (Sichtkontrolle im Mikroskop).
8. Waschen in 0,3%iger Ammoniaklösung für 3 Minuten.
9. Fixieren in 5%iger Natriumthiosulfat-Pentahydratlösung für 5 Minuten.
10. Waschen in Aqua dest. dreimal je 5 Minuten.
11. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.1) und Eindecken mit Hilfe des Folieneindeckautomaten Tissue-Tek® (Vogel GmbH & Co KG).

3.3.4 Protokoll der Silberfärbung nach Bodian (modifiziert)

1. Waschen des Kupferdrahtes (2 g Kupferdraht für 50 ml 1%iger Albumosesilber-Methenaminlösung) in 5%iger Salpetersäure für 30 Minuten, in Leitungswasser

- dreimal für je 5 Minuten, in Aqua dest. dreimal für je 5 Minuten und in Aqua bidest. dreimal für je 5 Minuten.
2. Entparaffinieren der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.1).
 3. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
 4. Inkubation der Schnitte in 1%iger Albumosesilber-Methenaminlösung (siehe Anhang) auf dem gewaschenen Kupferdraht für 16 Stunden bei 37°C.
 5. Waschen in Aqua dest. (kurz eintauchen).
 6. Inkubation in 1%iger Hydrochinonlösung (siehe Anhang) für 10 Minuten bei 45°C.
 7. Waschen in Aqua dest. dreimal für je 2 Minuten.
 8. Vergolden in 0,5%iger Goldchloridlösung für 30 Minuten bis die Schnitte einen grau violetten Farbton aufweisen.
 9. Waschen in Aqua dest. dreimal für je 2 Minuten.
 10. Entwickeln in 2%iger Oxalsäurelösung für 10 Minuten.
 11. Waschen in Aqua dest. dreimal für je 2 Minuten.
 12. Fixieren in 5%iger Natriumthiosulfat-Pentahydratlösung für 5 Minuten.
 13. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.1) und Eindecken mit Hilfe des Folieneindeckautomaten Tissue-Tek[®] (Vogel GmbH & Co KG).

3.3.5 Protokoll der Silberfärbung nach Gallyas

1. Entparaffinieren der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.1).
2. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
3. Inkubation in Lanthannitrat-Natriumacetatlösung (siehe Anhang) für 1 Stunde.
4. Waschen in Aqua dest. für 1 Minute.
5. Inkubation in alkalischer Silberiodidlösung (siehe Anhang) für eine Minute.
6. Waschen in 0,5%iger Essigsäure, dreimal für je 5 Minuten.
7. Inkubation in physikalischem Entwickler (siehe Anhang) für ca. 15 Minuten (Sichtkontrolle im Mikroskop).
8. Waschen in 0,5%iger Essigsäure, zweimal für je 5 Minuten.
9. Fixieren in 1%iger Natriumthiosulfat-Pentahydratlösung für 5 Minuten.
10. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
11. Vergolden in 0,1%iger Goldchloridlösung für 5 Minuten.
12. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
13. Fixieren in 1%iger Natriumthiosulfat-Pentahydratlösung für 5 Minuten, bis die Schnitte einen hellgrauen Farbton aufweisen.

14. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
15. Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Eindecken mit Hilfe des Folieneindeckautomaten Tissue-Tek[®] (Vogel GmbH & Co KG).

3.3.6 Protokoll der Kongorot-Färbung

1. Entparaffinieren der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.1).
2. Kurz waschen in Aqua dest.
3. Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun[®] für 5 Minuten.
4. Kurz waschen in Aqua dest.
5. Bläuen in fließendem Leitungswasser für ca. 10 Minuten.
6. Vorbehandlung in alkalischer Kochsalzlösung (siehe Anhang) für 20 Minuten.
7. Inkubation der nicht abgespülten Schnitte in 0,5%iger Kongorotlösung (siehe Anhang) für 50 Minuten.
8. Rasch Entwässern in 96%igem Alkohol dreimal für je 2 Minuten.
9. Eintauchen in Roti[®]-Histol für 5 Minuten, anschließend in Xylol für 5 Minuten und Eindecken mit Hilfe des Folieneindeckautomaten Tissue-Tek[®] (Vogel GmbH & Co KG).

3.3.7 Kontrollen

Als positive Kontrollen für die histochemischen Färbungen wurden Gehirnschnitte von Menschen mit Plaques verwendet (S4/95; S103/93), die von Prof. Dr. Schachenmayr (Institut für Neuropathologie, Gießen) zur Verfügung gestellt wurden.

3.4 Immunhistologie

Immunhistologische Techniken wurden eingesetzt, um das β A4-Protein, das Amyloidvorläuferprotein (APP), saures Gliafaserprotein (GFAP) in Astrozyten, das Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC II)-Antigen und das Lektin *Bandeiraea simplicifolia* (BS-1) auf aktivierten Mikrogliazellen, Vimentin (Vim)-positive Zellen, Neurofilament (NF)-positive Axone und Sphäroide, pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) nachzuweisen.

3.4.1 Seren und Antikörper

Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper wurden in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) verdünnt (Alldinger et al., 1996). Die primären Antikörper gegen IL-6, IL-12 und TNF- α wurden in TBS mit 20%igem Schweineserum und der Primärantikörper gegen IL-1 in TBS mit 40%igem Schweineserum verdünnt (Gröne et al., 2000).

Blocking-Seren:

- a) Pferdeserum (unverdünnt), Pferdeserum 1:5 verdünnt in TBS
- b) Schweineserum (unverdünnt), Schweineserum 1:10 verdünnt in TBS

Primäre Antikörper und Lektine:

Die verwendeten Antikörper und Lektine sind in *Tab. 1* zusammengefaßt.

- a) monoklonaler anti-humaner **β -Amyloid**-Antikörper aus der Maus, Klon 6F/3D (Novocastra, Hamburg)
- b) monoklonaler anti-humaner **Amyloidvorläuferprotein**-Antikörper aus der Maus, Klon 22C11 (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim)
- c) polyklonaler anti-bovines **saures Gliafaserprotein**-Antikörper aus dem Kaninchen (Dako, Hamburg)
- d) monoklonaler anti-kanines **Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II-Antigen**-Antikörper aus der Ratte, Klon R4A1, freundlicherweise von Frau Dr. Vogl (GSF-National Research Center for Environment and Health, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt
- e) monoklonaler anti-porcines **Vimentin**-Antikörper aus der Maus (Dako, Hamburg)
- f) monoklonaler anti-humaner **Neurofilament**-Antikörper aus der Maus (Dako, Hamburg)
- g) polyklonaler anti-humaner **Interleukin-1-, -6-, -12-** und anti-humaner **TNF- α** -Antikörper aus dem Kaninchen (Genzyme Diagnostics, Rüsselsheim)
- h) biotiniliertes **Lektin aus Bandeiraea simplicifolia** gegen α -D-Galaktose

Die Antikörper sind, bis auf den monoklonalen Antikörper gegen das MHC Klasse II-Antigen, der dankenswerterweise von Frau Dr. C. Vogl (GSF-National Research Center for Environment and Health, München) zur Verfügung gestellt wurde, alle kommerziell erhältlich (siehe Anhang).

Tabelle 1: Spezifität, Klon-Nummer, Isotyp und Verdünnung der eingesetzten monoklonalen und polyklonalen Antikörper sowie die Herkunft des Lektins.

Spezifität der Antikörper	Klon	Isotyp	Spezies	Verdünnung
Humanes β -Amyloid	6F/3D	IgG ₁	Maus	1:10
Humanes Amyloidvorläuferprotein	22C11	IgG ₁	Maus	1:40
Bovines Saures Gliafaserprotein	-	Polyklonal	Kaninchen	1:500
Kanines MHC Klasse II-Antigen	R4A1	IgG _{2a}	Ratte	1:500
Porcines Vimentin	V9	IgG ₁	Maus	1:50
Humanes Neurofilament	2F11	IgG ₁	Maus	1:400
Humanes Interleukin-1	-	polyklonal	Kaninchen	1:75
Humanes Interleukin-6	-	polyklonal	Kaninchen	1:75
Humanes Interleukin-12	-	polyklonal	Kaninchen	1:250
Humaner Tumor-Nekrose-Faktor- α	-	polyklonal	Kaninchen	1:500

Lektin	Herkunft	nachgewiesener Zucker	Verdünnung
BS-1 (biot.)	Bandeiraea simplicifolia	α -D-Galaktose	2 μ l / ml TBS

Sekundäre Antikörper:

- biotinierter Pferd-anti-Maus-Antikörper (Vector Laboratories, BA 2000, Verdünnung: 9 μ l in 1 ml TBS)
- biotinierter Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper (Vector Laboratories, BA 4000, Verdünnung: 9 μ l in 1 ml TBS)
- biotinierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Vector Laboratories, BA 1000, Verdünnung: 9 μ l in 1 ml TBS)

Tertiärer Antikörper:

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC, Vector Laboratories, PK 4000, Verdünnung: 9 μ l Avidin und 9 μ l Biotin in 1 ml TBS)

3.4.2 Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode) für Paraffinschnitte

In Anlehnung an die von Hsu et al. (1981) und Alldinger et al. (1996) beschriebene Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Roti-Histol[®] dreimal für 5 Minuten, in Isopropylalkohol zweimal für 5 Minuten, in 96%igem, 70%igem und 50%igem Alkohol für je 3 Minuten.
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,5%igem H₂O₂ in Methanol reinst (siehe Anhang) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dieser Schritt entfällt für BS-1.
3. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS (siehe Anhang) für je 5 Minuten.
4. Umrandung der Schnitte mittels eines hydrophoben Stifts (PAP-Pen[®]).
5. **Demaskierung:**
 - a) des **β–Amyloids** durch Inkubation der Schnitte in 98%iger Ameisensäure (Fluka Feinchemikalien GmbH, siehe Anhang) für 3 Minuten bei Raumtemperatur in Anlehnung an Doi-Yi et al. (1991), Vinters et al. (1988) und Kitamoto et al. (1987).
 - b) des **Amyloidvorläuferproteins** durch Inkubation der Schnitte in vorgewärmter TUF-Lösung ("target unmasking fluid", Kreatech Diagnostics, siehe Anhang), 1:3 verdünnt in Aqua dest., für 10 Minuten bei 90°C.
 - c) des **sauren Gliafaserproteins** durch Inkubation der Schnitte für 15 Minuten in einer 0,25%igen Triton X-100-Lösung (Serva, siehe Anhang) bei Raumtemperatur. Danach folgt zweimaliges Waschen in TBS und eine Inkubation der Schnitte für 60 Minuten in einer 0,25%igen Trypsinlösung in vorgewärmtem Aqua dest. mit 0,02% CaCl₂ (pH 7,6) bei 37°C.
 - d) des **Vimentins** durch eine Inkubation der Schnitte für 30 Minuten in 0,25%iger Triton X-100-Lösung bei Raumtemperatur.
 - e) des **Interleukin-1**, **Interleukin-6** und des **TNF-α** durch Inkubation für 60 Minuten in 0,25%iger Trypsinlösung in vorgewärmtem Aqua dest. mit 0,02 g CaCl₂ (pH 7,6) bei 37°C.
 - f) war nicht erforderlich für den Nachweis von **Interleukin-12**, **Neurofilament** und **BS-1**.
6. Anschließend dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten.
7. Inkubation der Schnitte mit **Blocking-Serum**:

- a) für den Nachweis von **β -Amyloid** mit unverdünntem Pferdeserum für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
 - b) für den Nachweis des **sauren Gliafaserproteins** mit Schweineserum, 1:10 in TBS verdünnt, für 30 Minuten bei Raumtemperatur.
 - c) für den Nachweis des **Amyloidvorläuferproteins** und **Vimentin** mit Pferdeserum, 1:5 in TBS verdünnt, für 30 Minuten bei Raumtemperatur.
 - d) für den Nachweis des **Interleukin-1, -6, -12** und **TNF- α** mit Schweineserum für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
 - e) für den Nachweis des **Lektins BS-1** und **Neurofilament** nicht nötig.
8. Absaugen des Blocking-Serums, Auftragen des primären Antikörpers und Inkubation für 16 Stunden bei 4°C (feuchte Kammer) im Kühlschrank.
 9. Absaugen des primären Antikörpers und dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten.
 10. Auftragen des sekundären Antikörpers und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur.
 11. Absaugen des sekundären Antikörpers und dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten.
 12. Inkubation der Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur (Herstellung des Avidin-Biotin-Komplexes mindestens 30 Minuten vor Gebrauch).
 13. Absaugen des Avidin-Biotin-Komplexes und dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten.
 14. Inkubation der Schnitte mit 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) in 0,1 M Imidazol-HCl-Puffer, pH 7,1 (siehe Anhang) mit 0,3%igem H₂O₂ für 10 Minuten bei Raumtemperatur, dabei vorsichtiges Rühren auf einem Magnetrührer.
 15. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten.
 16. Gegenfärbung in Papanicolaou-Lösung (1:20 verdünnt in Aqua dest.), anschließend Bläuen in Leitungswasser für 10 Minuten und kurzes Eintauchen der Schnitte in Aqua dest.
 17. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 50%iger, 70%iger, 80%iger und 96%iger Alkohol für je 3 Minuten und zweimal Isopropylalkohol für je 5 Minuten, zuletzt in Roti[®]-Histol dreimal für je 2 Minuten, anschließend Eindecken mit Hilfe des Folieneindeckautomaten Tissue-Tek[®] (Vogel GmbH & Co KG).

In der Immunhistologie für den Nachweis des Lektins BS-1 entfallen Schritt 10 und 11. Der Avidin-Biotin-Komplex wird direkt aufgetragen, da das Lektin in biotinierter Form vorliegt.

3.4.3 Doppelmarkierung

Für die gleichzeitige Darstellung von Plaques und Astrozyten wird in einem ersten Schritt die Campbell-Switzer-Methode (siehe 3.3.1) durchgeführt, wobei die Schnitte am Ende nicht in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden, sondern in TBS verbleiben. In einem zweiten Schritt wird die Immunhistologie zum Nachweis des sauren Gliafaserproteins (GFAP) in Astrozyten (siehe 3.4) durchgeführt.

3.4.4 Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode) für Gefrierschnitte

Für den immunhistologischen Nachweis des MHC Klasse II-Antigens auf aktivierten Mikrogliazellen wurden Gefrierschnitte verwendet. Prinzipiell basiert die Durchführung der Immunhistologie am Gefrierschnitt auf dem oben aufgeführten Protokoll (siehe 3.4.2) in Anlehnung an Wünschmann et al. (2000). Im Vergleich zu dem Protokoll von 3.4.2 finden sich folgende Änderungen:

1. entfällt, statt dessen werden die bei -70°C gelagerten Schnitte für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet.
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,03%igem H₂O₂ in TBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur.
3. wie bei 3.4.2
4. wie bei 3.4.2
5. Demaskierung entfällt.
6. wie bei 3.4.2
7. Eine Inkubation der Schnitte mit Blocking-Serum ist nicht nötig.
8. Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper für 16 Stunden bei 4°C (feuchte Kammer im Kühlschrank)
- 9., 10., 11., 12., 13. wie bei 3.4.2
14. Inkubation der Schnitte mit 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) in 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer, pH 7,1 (siehe Anhang) mit 0,01%igem H₂O₂ für 10 Minuten bei Raumtemperatur, dabei vorsichtiges Rühren auf einem Magnetrührer.
- 15., 16., 17. wie bei 3.4.2

3.4.5 Kontrollen

Als positive Kontrollen für die immunhistologischen Reaktionen wurden für das β -Amyloid und das Amyloidvorläuferprotein Gehirnschnitte von Menschen mit Plaques (S4/95, S103/93) verwendet, die von Prof. Dr. Schachenmayr (Institut für Neuropathologie, Gießen) zur Verfügung gestellt wurden. Darüber hinaus wurden saures Gliafaserprotein-, MHC Klasse II-Antigen, BS-1-, Vimentin-, Neurofilament-, IL-6 und TNF- α -positive Gehirnschnitte von Hunden mit natürlicher Staupevirusinfektion mitgeführt. Als positive Kontrollen für die IL-1- und IL-12-Expression dienten Zellpellets (DH82-Zelllinie, nicht-infiziert, 9. Tag), die eine spontane Expression dieser Zytokine aufwiesen. Als negative Kontrollen wurden Folgeschnitte des zu untersuchenden Präparates mitgeführt, welche statt mit dem primären Antikörper mit "minimal essential medium with Earle's salt" (MEME), mit "tris-buffered saline" (TBS), mit Serum von nicht-immunisierten Kontrollkaninchen (KK) oder einem monoklonalen Antikörper gegen T-Zelloberflächenantigen von Hühnerlymphozyten (T1) inkubiert wurden.

3.5 TUNEL-Methode für den Nachweis apoptotischer Zellen

Für den *in situ*-Nachweis von "terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-vermittelte dUTP nick-end-labeling" (TUNEL)-positiven Zellen bzw. DNA-Doppelstrangbrüchen in apoptotischen Zellen wurde der kommerziell erhältliche "In Situ Cell Death Detection Kit, AP" (Boehringer Mannheim) eingesetzt.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Roti-Histol[®] zweimal für 5 Minuten, in Isopropylalkohol zweimal für 5 Minuten, in 96%igem Alkohol und in 70%igem Alkohol für je 5 Minuten.
2. Verbringen der Schnitte in Aqua dest. für 5 Minuten.
3. Vorbehandlung der Schnitte mittels Proteinase K (20 μ g/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) für 25 Minuten bei Raumtemperatur.
4. Zweimaliges Waschen der Schnitte in PBS (siehe Anhang) für 5 Minuten, Umrandung des Gewebes mit einem hydrophoben Stift (PAP-Pen[®]) und Auflegen der Schnitte auf ein Tablett.
5. Herstellen und Auftragen des TUNEL-Reaktionsgemischs. Hierfür werden 450 μ l "Label Solution" (Fertiglösung) mit 50 μ l "Enzyme Solution" (Fertiglösung) vermischt

und anschließend werden pro Schnitt 50 µl Reaktionsgemisch aufgetragen und das Gewebe mit einem Streifen Gelbond® (Biozym) abgedeckt.

6. Inkubation der Schnitte in einer feuchten Kammer für 60 Minuten bei 37 °C.
7. Dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS.
8. Auftragen des "Converter-AP" (mit alkalischer Phosphatase konjugierter Schaf-anti-Fluoreszein-Antikörper), Abdecken der Schnitte mit Gelbond®-Streifen und Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei 37 °C. Anschließend dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS.
9. Auftragen eines chromogenen Substrates (Fast Red®, DCS Innovative Diagnostiksysteme) und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
10. Zweimaliges Waschen der Schnitte in PBS für je 5 Minuten.
11. Färben der Schnitte in Mayers Hämalaun (siehe Anhang) für 3 Minuten.
12. Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 3 Minuten.
13. Einbringen der Schnitte in PBS und Eindecken mittels Glyceringelantine.

3.5.1 Kontrollen

Als positive Kontrolle wurde der Gewebeschnitt eines Rektumpolypen eines 13jährigen Deutschen Schäferhundes (T-9734/99) benutzt, der in der HE-Übersichtsfärbung zahlreiche apoptotische Zellen, die sich durch ein geschrumpftes, eosinophiles Zytoplasma, eine halbmondförmige Chromatinkondensation und apoptotische Kernkörperchen auszeichneten (Granville et al., 1998), aufwies.

3.6 Auswertung der Schnitte

Die **HE-gefärbten Gehirnschnitte** aller Hunde (Nr. 1-130, *Tab. 4*, 1 Monat bis 18 Jahre) wurden pathologisch-histologisch untersucht. Die Gehirnschnitte der jungen Hunde (Gruppe 1, 2-3 Jahre, n = 5) und der alten Hunde ohne Plaques (Gruppe 2, 11-14 Jahre, n = 5) und der alten Hunde mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre, n = 30) wurden insbesondere im Hinblick auf eine vorhandene **Meninxfibrose**, eine **Fibrose des Plexus chorioideus**, **Lipofuszinablagerungen in Neuronen und perivaskulären Makrophagen** in der grauen und weißen Substanz und eine vermehrte Anzahl von **Sphäroiden und sogenannten eosinophilen Kügelchen in der weißen Substanz** ausgewertet. Diese pathologisch-histologischen Befunde wurden nach dem geschätzten Schweregrad der Veränderung semiquantitativ ausgewertet (0

= keine, + = geringe, ++ = mittelgradige, +++ = hochgradige Veränderung). Das Auftreten von **Mikroblutungen** in der grauen Substanz wurde als ja / nein -Aussage bewertet.

Im Rahmen des **Methodenvergleichs** (Histochemie/Immunhistologie) wurden für jede Methode die nachgewiesenen Plaques in der grauen Substanz ausgezählt. Mit Hilfe eines Mikroskops (IX70, Fa. Olympus, Hamburg) wurde in jeder der zwei Schnittebenen an Folgeschnitten die Plaqueanzahl für jede Methode in fünf Zählfeldern mit Hilfe einer Netzmikrometerplatte (Olympus U-OCMSQ, Hamburg), die in die Okulare des Mikroskops eingelegt wird, bestimmt. Die in der 40er Vergrößerung (4er Objektiv) entstandene Zählfläche beträgt $6,25 \text{ mm}^2$. Die Anzahl Plaques pro $6,25 \text{ mm}^2$ wird in der Folge Plaquedichte genannt.

Die MHC Klasse II Antigen-positiven **Mikrogliazellen** wurden in den Gehirnen von acht jungen Kontrollhunden (Nr. 131-138, *Tab. 4*, 9 Monate) und von 12 Hunden aus Gruppe 3 (Nr. 67, 71, 92, 98, 105, 112, 115, 117, 121, 123, 127, 129, *Tab. 4*, 10-18 Jahre) in einem Gefrierschnitt in fünf zufällig ausgewählten Lokalisationen in der grauen und der weißen Substanz in der 400er Vergrößerung (40er Objektiv) gezählt. Die GFAP-positiven **Astrozyten** wurden in den Gehirnen der Hunde aus Gruppe 1 (2-3 Jahre), 2 und 3 (10-18 Jahre) in einem Gehirnschnitt in fünf zufällig ausgewählten Lokalisationen in der grauen und der weißen Substanz in der 400er Vergrößerung (40er Objektiv) gezählt. In dieser Vergrößerung beträgt die durch die Netzmikrometerplatte entstandene Zählfläche $0,0625 \text{ mm}^2$. Später erfolgt eine Umrechnung der Anzahl Zellen pro $6,25 \text{ mm}^2$. Weiterhin wurde die Topografie der Zellen, die Morphologie und die Intensität der Immunreaktion berücksichtigt.

Die Auswertung der immunhistologischen Markierung der **β A4-Proteinablagerungen** in den meningealen und parenchymalen Gefäßen, des **Amyloidvorläuferproteins**, **Neurofilament-**, **Vimentin-**, **BS-1-positiver Zellen**, der **Zytokine** und **TUNEL-positiver Zellen** in grauer und weißer Substanz erfolgte für die jungen Hunde aus Gruppe 1 (2-3 Jahre) sowie die alten Hunde der Gruppe 2 und 3 (10-18 Jahre) in einem Gehirnschnitt nach dem geschätzten Schweregrad der Veränderung semiquantitativ wie folgt: 0 (kein Signal), + (schwaches positives Signal bzw. Braunfärbung einzelner Zellen, Gefäßen oder Parenchymareale), ++ (mittelgradiges positives Signal bzw. Braunfärbung weniger Zellen, Gefäße, Parenchymareale) und +++ (hochgradiges positives Signal bzw. Braunfärbung zahlreicher Zellen, Gefäße, Parenchymareale). Das Auftreten von **β A4-Proteinablagerungen im Hippocampus** wurde in Form einer ja / nein-Aussage beurteilt. Zusätzlich wurde für jedes nachweisbare Antigen die Morphologie und Topografie in der weißen und grauen Substanz berücksichtigt.

3.7 Statistische Analyse

Die Datenhaltung und -auswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0, (Dixon, 1993) durchgeführt. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm ORIGIN (Version 6.0) erzeugt. Zur **Beschreibung der Daten** wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima und der Stichprobenumfang berechnet. Bei einer rechts- bzw. linksschiefen Verteilung positiver, quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten und Streufaktoren vorgenommen. Bei den semiquantitativen Variablen erfolgte die Datenbeschreibung durch die Angabe der Mediane sowie der kleinsten (Minimum) und der größten (Maximum) Beobachtungen.

Zur statistischen Prüfung des **Methodenvergleiches** auf Signifikanz wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung im Faktor Methode mit dem Programm BMDP7D durchgeführt. Falls sich hierbei signifikante Unterschiede ermitteln ließen, wurden die Gruppen anschließend paarweise mit dem Student-Newman-Keuls-Verfahren verglichen. Bei **semiquantitativen Merkmalen**, wie z.B. den β A4-Proteinablagerungen in den meningealen und parenchymalen Gefäßen, des Amyloidvorläuferproteins, Neurofilament-, Vimentin-, BS-1-positiver Zellen, der Zytokine und TUNEL-positiver Zellen in grauer und weißer Substanz bei jungen Hunden (Gruppe 1, 2-3 Jahre) und alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre), kam bei Gruppenvergleichen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bzw. der Kruskal-Wallis-Test mit anschließenden paarweisen Vergleichen nach Nemenyi unter Verwendung des Programms BMDP3S zum Einsatz. Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei **quantitativen Merkmalen**, wie z.B. der Anzahl MHC Klasse II Antigen-positiver Mikrogliazellen und GFAP-positiver Astrozyten mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe der Korrelations- bzw. Regressionsgeraden oder mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Die Gegenüberstellung **qualitativer Merkmale**, wie z.B. des Auftretens von Mikroblutungen in der grauen Substanz und β A4-Proteinablagerungen im Hippocampus bei jungen und alten Hunden, erfolgte durch mit dem Programm BMDP4F erzeugte Häufigkeitstabellen, die mit dem Fisher-Test/Chi-Quadrat-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft wurden. Hier kam ebenso wie bei den Nemenyi-Vergleichen und dem Student-Newman-Keuls-Test ein Computerprogramm der AG Bio-

mathematik und DV zum Einsatz. Bei der Benennung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Merkmale der untersuchten Hunde

4.1.1 Altersverteilung

Die für die Untersuchungen vorliegenden 138 Hunde waren im Alter von einem Monat bis zu 18 Jahren und wurden in einem Zeitraum von vier Jahren (1996-1999) gesammelt. Die Tagebuchnummern, Rasse, Alter und die Erkrankungs- bzw. Todesursache der einzelnen Hunde sind in *Tab. 4* (Anhang 9.4) aufgeführt. In der *Abb. 5* ist die Anzahl der Hunde pro Altersgruppe dargestellt.

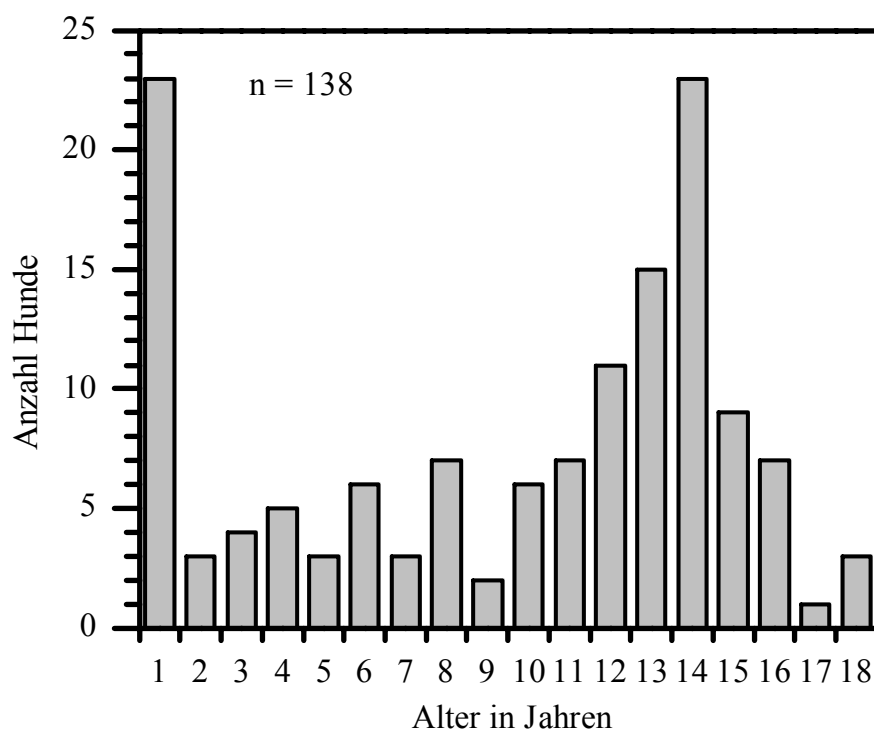


Abbildung 5: Altersverteilung der untersuchten Hunde im Alter von einem Monat bis zu 18 Jahren (n = Anzahl der Hunde).

4.1.2 Gewichtsverteilung

Anhand des Körpergewichts wurden die Hunde ab dem 8. Lebensjahr, das in der Literatur als Beginn des sogenannten geriatrischen Lebensabschnittes angesehen wird, in Anlehnung an Danckert und Kraft (1997) in kleine (bis zu 15 kg Körpergewicht), mittelgroße (15-45 kg

Körpergewicht) und große Hunde (über 45 kg Körpergewicht) eingeteilt. Aus der *Abb. 6* wird deutlich, daß mit zunehmendem Alter mehr mittelgroße und kleine Hunde als große Hunde vorlagen. Von vier der insgesamt 91 Hunde, die 8 Jahre und älter waren, lag keine Gewichtsangabe vor. Bei den 8 bis 9jährigen Hunden fanden sich nur zwei Hunde, die ein Gewicht von über 45 kg aufwiesen und so zu den großen Hunderassen zählen. Bei den 10 bis 16jährigen Hunden fanden sich nur mittelgroße und kleine Hunde und bei den 17 bis 18jährigen Hunden fanden sich nur noch kleine Hunde mit einem Körpergewicht von unter 15 kg Körpergewicht.

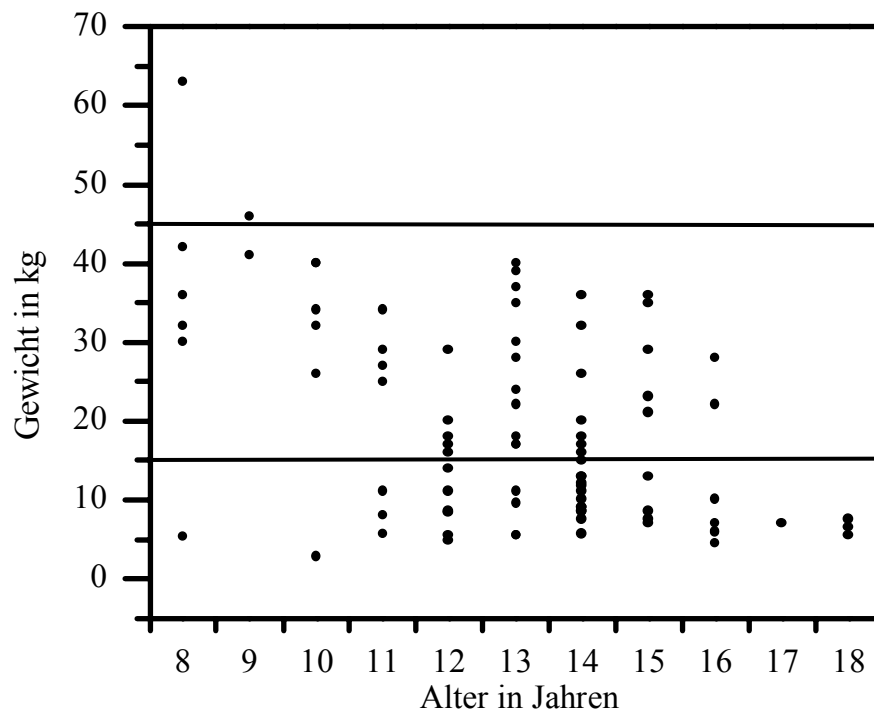


Abbildung 6: Größeneinteilung der untersuchten Hunde ab dem 8. Lebensjahr in große (über 45 kg), mittelgroße (15-45 kg) und kleine Hunde (unter 15 kg) (Anzahl der Hunde = 87).

4.1.3 Rassenverteilung

Die prozentualen Anteile der einzelnen Hunderassen sind in *Tab. 2* angegeben. 32,6% der Hunde waren Mischlingshunde und 67,4% reinrassige Hunde. Unter den Rassehunden war der Deutsche Schäferhund mit 9,4% und der Dackel mit 8,7% am häufigsten vertreten. Unter dem Namen Dackel wurden hier Rauhaardackel-, Langhaar-, Kurzhaardackel und Teckel zusammengefaßt.

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der untersuchten Mischlinge und Rassehunde

Hunderasse	Anzahl (n)	Hunderasse	Anzahl (n)
Mischlinge	45	Pyrenäenhund	1
Deutscher Schäferhund	13	Rhodesian Ridgeback	1
Dackel	12	Wachtel	1
Marshall Beagle	8	Golden Retriever	1
Rottweiler	7	Chihuahua	1
Pudel	5	Samojede	1
Berner Sennenhund	5	Boxer	1
West Highland Terrier	4	Deutsch-Kurzhaar	1
Riesenschnauzer	4	Bullterrier	1
Pekinese	2	Bobtail	1
Labrador	2	Eurasier	1
Mittelschnauzer	2	Setter	1
Fox Terrier	2	Airedale Terrier	1
Yorkshire Terrier	2	Labrador-Retriever	1
Cocker Spaniel	2	Chow-Chow	1
Schweißhund	2	Magyar Vizsla	1
Dalmatiner	2	Shih-Tzu	1
Dobermann	2	Gesamtanzahl der Hunde	138

4.2 Methodenvergleich

In der Literatur finden sich in humanmedizinischen Studien zahlreiche unterschiedliche Methoden für die Darstellung von Plaques, neurofibrillären Bündeln und der kongophilen Angiopathie. Es werden unterschiedliche histochemische und immunhistologische Methoden beschrieben, deren Ergebnisse erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität aufweisen. Aufgrund der Tatsache, daß drei Silberfärbungen in dieser Arbeit verwendet wurden, über die in der Literatur bisher noch keine Angaben hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für die Darstellung von Plaques, neurofibrillären Bündeln und einer kongophilen Angiopathie im Gehirngewebe vom Hund vorliegen, sollten diese Methoden vergleichend getestet und wenn möglich für den Hund etabliert werden. Für den Methodenvergleich wurden Folgeschnitte aus zwei Regionen der Gehirne von 30 alten Hunden (Gruppe 3, 10-18 Jahre) untersucht.

4.2.1 Immunhistologie

4.2.1.1 Immunhistologische Markierung des β A4-Proteins in Hundegehirnen

Die immunhistologische Markierung des β A4-Proteins an zwei Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gehirnschnitten (Schnittebene Nr. 2 und 5) mittels eines monoklonalen Antikörpers (Klon 6F/3D) zeigte bei 100% der Hunde ($n = 30$) braun gefärbte Plaques, die eine unterschiedliche Größe von ca. 30 bis zu 150 μ m aufwiesen und in den oberflächlichen Kortexschichten 2 bis 4 lagen (*Abb. 19*). Zusätzlich zu diesen kondensierten, gut begrenzten Plaques konnten in der Immunhistologie großflächige, wolkige, fein-granuläre β A4-Proteinablagerungen in den tiefen Kortexschichten 5 und 6 dargestellt werden, die sich teils über die gesamte Länge einer Großhirnfurche erstreckten. Die meningealen Gefäße wiesen bei 97% der Hunde segmentale oder zirkuläre, braun gefärbte β A4-Proteinablagerungen in der Tunica media auf (*Abb. 20*). Zusätzlich fanden sich bei 90% der Hunde β A4-Proteinablagerungen in den parenchymalen Kapillaren der grauen Substanz (*Abb. 21*). Diese β A4-Protein-positiven Kapillaren lagen immer in Gruppen zusammen, herdförmig in den Kortexschichten 2 bis 4. Im Hippocampus zeigte sich ein scharf begrenztes, fein-granuläres, braun gefärbtes Band im Stratum moleculare (*Abb. 22*). In der weißen Substanz fand sich bei keinem Hund ein positives Signal. Klassische/neuritische Plaques mit einem kondensierten β A4-Proteinkern und einem Kranz aus dystrophischen Neuriten, wie sie für den Menschen beschrieben werden, fanden sich nicht.

4.2.1.2 Immunhistologische Markierung des β A4-Proteins in humanem Kontrollgewebe

In den Gehirnschnitten eines Menschen fanden sich mittels Immunhistologie braun angefärbte diffuse (*Abb. 23*) und klassische/neuritische Plaques in der grauen Substanz der Großhirnrinde (*Abb. 24*). Vereinzelt trat ein positives Signal in den meningealen Gefäßen auf (*Abb. 25*). In der weißen Substanz fand sich kein positives Signal.

4.2.2 Histochemie

4.2.2.1 Silber- und Kongorotfärbung in Hundegehirnen

Je zwei Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gehirnschnitte (Schnittebene Nr. 2 und 5) pro Hund wurden mit den fünf Silberfärbungen und der Kongorot-Färbung untersucht. Mittels der **Campbell-Switzer-Methode** konnten bei 90% der Hunde ($n = 27$) in der grauen Substanz

der Großhirnrinde Plaques gefunden werden. Die Plaques bestanden aus einem feinen, fädigen, schwarz gefärbten Netzwerk (*Abb. 26*) und entsprachen hinsichtlich der Größe (30 μm bis 150 μm) und der laminären Verteilung den Ergebnissen der immunhistologischen Färbung. Die immunhistologisch nachweisbaren großflächigen, wolkigen βA4 -Proteinablagerungen in den tiefen Kortexschichten 5 und 6 fanden sich nicht. Die graue Substanz färbte sich diffus grau und die Axone in der weißen Substanz schwarz an (*Abb. 27*). Die meningealen Gefäße und die parenchymalen Kapillaren der grauen Substanz zeigten ebenfalls eine hellgraue Hintergrundfärbung. Gefäße mit immunhistologisch nachgewiesenen βA4 -Ablagerungen zeigten eine spezifische, segmentale Schwarzfärbung (*Abb. 28 und 29*). Die **Reusche-Methode** zeigte bei 67% der 30 Hunde gleichartige, fein-fädige, schwarz gefärbte Plaques in der grauen Substanz der Großhirnrinde in der Kortexschichten 2 bis 4 (*Abb. 30*). Die graue Substanz wies ebenso wie die Axone in der weißen Substanz eine gelbe und Sphäroide eine dunkelgelbe Färbung auf (*Abb. 31*). Die meningealen Gefäße zeigten ebenso eine gelbe Färbung und an Stellen mit immunhistologisch nachgewiesenen βA4 -Proteinablagerungen trat eine spezifische, segmentale, dunkelbraune Färbung auf (*Abb. 32*). Die immunhistologisch βA4 -Protein-positiven Kapillaren in der grauen Substanz waren nicht angefärbt. Die **Bielschowsky-Methode** zeigte eine schwache Anfärbung braun-schwarzer Plaques bei 60% der Hunde ($n = 18$) an (*Abb. 33*). Die graue Substanz hatte einem hellbraunen Farbton und die Axone und Sphäroide in der weißen Substanz färbten sich braun-schwarz an (*Abb. 34*). Die meningealen Gefäße und parenchymalen Kapillaren färbten sich unspezifisch braun. Die **modifizierte Bodian-Methode** wies nur bei 10% der Hunde vereinzelte schwach angefärbte grau-violette Plaques auf, die sich aber kaum von dem violetten Farbton der grauen Substanz abhoben. In der weißen Substanz zeigten die Axone die gleiche violette Hintergrundfärbung wie die graue Substanz; und die Sphäroide färbten sich dunkelviolet (*Abb. 35*). Die meningealen Gefäße und die Kapillaren in der grauen Substanz wurden dunkelviolet angefärbt und an Stellen mit immunhistologisch nachweisbaren βA4 -Proteinablagerungen fand sich eine segmentale, spezifische hellrote Anfärbung (*Abb. 36 und 37*). Die **Gallyas-Methode** färbte keine Plaques an. Ebenso blieben alle übrigen Gewebsstrukturen ungefärbt. Mit keiner der genannten Silberfärbungen konnten klassische/neuritische Plaques und/oder neurofibrilläre Bündel dargestellt werden, wie sie für den Menschen beschrieben werden. Die **Kongo-rot-Färbung** färbte die Plaques im Neuropil bei keinem Tier an. Die graue Substanz zeigte eine blasse rötliche Farbe. In den meningealen Gefäßen bei 93% der Hunde fand sich an Stellen mit immunhistologisch nachweisbaren βA4 -Proteinablagerungen eine spezifische, segmentale Rotfärbung (*Abb. 38a*). Die Kapillaren der grauen Substanz färbten sich nicht an.

Im polarisierten Licht zeigte sich an diesen Stellen die durch Doppelbrechung hervorgerufene charakteristische grün-gelbliche Färbung des in β -Faltblattstruktur vorliegenden β A4-Proteins (*Abb. 38b*).

4.2.2.2 Silber- und Kongorotfärbung in humanem Kontrollgewebe

In den mitgeführten Gehirnschnitten eines Menschen fanden sich mittels der Silberfärbungen nach Campbell-Switzer, Reusche, Bielschowsky (modifiziert) und Bodian (modifiziert) diffuse und klassische/neuritische Plaques. Die Kongorot-Färbung markierte hier den zentralen kondensierten Amyloidkern der klassischen/neuritischen Plaques, nicht jedoch die diffusen Plaques. Darüber hinaus wiesen die Methoden nach Campbell-Switzer, Reusche, Bielschowsky, Bodian und Gallyas neurofibrilläre Bündel im Zytoplasma von Neuronen nach.

Die **Campbell-Switzer-Methode** zeigte schwarz gefärbte diffuse Plaques (*Abb. 39*), die sich nur aus einem fein-fädigen Netzwerk zusammensetzten, und klassische/neuritische Plaques, die aus einem kondensierten Amyloidkern und einem Kranz dystrophischer Neuriten bestehen (*Abb. 40*) und schwarz gefärbte neurofibrilläre Bündel (*Abb. 41*). Das Neuropil färbte sich homogen grau und die Axone in der weißen Substanz schwarz. Die meningealen Gefäße und parenchymalen Kapillaren der grauen Substanz zeigten die unspezifische graue Hintergrundfärbung. Die **Reusche-Methode** färbte diffuse (*Abb. 42*) und klassische/neuritische Plaques (*Abb. 43*) sowie neurofibrilläre Bündel schwarz (*Abb. 44*) und die graue Substanz zeigte eine gelbe Färbung. Die Axone in der weißen Substanz waren ebenso unspezifisch gelb gefärbt. Die meningealen Gefäße und die parenchymalen Kapillaren waren unspezifisch gelb angefärbt. Die **Bielschowsky-Methode** zeigte schwarz-braune diffuse (*Abb. 45*) und klassische/neuritische Plaques (*Abb. 46*) sowie neurofibrilläre Bündel (*Abb. 47*). Die graue Substanz und die Gefäße wiesen eine braune Hintergrundfärbung auf und die Axone in der weißen Substanz wurden deutlich schwarz angefärbt. Die **Bodian-Methode** zeigte hell-violett gefärbte diffuse (*Abb. 48*) und klassische/neuritische Plaques (*Abb. 49*) sowie neurofibrilläre Bündel (*Abb. 50*). Die graue Substanz, die Gefäße und die Axone in der weißen Substanz färbten sich violett. Die **Gallyas-Methode** zeigte schwarz gefärbte neurofibrilläre Bündel (*Abb. 51*). Das Neuropil, die Gefäße, sowie die Axone in der weißen Substanz färbten sich nicht an. Die **Kongorot-Färbung** färbte spezifisch den Amyloidkern der klassischen/neuritischen Plaques rot an (*Abb. 52a*), der in der Doppelbrechung grün aufleuchtete (*Abb. 52b*). Die graue Substanz war blass rötlich gefärbt.

4.2.3 Morphometrie und statistische Auswertung

Mittels einer morphometrischen Netzmikrometerplatte wurden die Plaques für jede Methode in der 40er Vergrößerung (4er Objektiv) in fünf Zählfeldern pro Schnitt und zwei Schnitten pro Gehirn ausgezählt. Die Fläche eines Zählfeldes beträgt $6,25 \text{ mm}^2$. Die Immunhistologie war die sensitivste Methode; sie detektierte bei den 30 Hunden 18 Plaques/ $6,25 \text{ mm}^2$ im geometrischen Mittel. Es folgten die Silberfärbungen wie die Campbell-Switzer-Methode mit 8 Plaques/ $6,25 \text{ mm}^2$, die Reusche-Methode mit 3 Plaques/ $6,25 \text{ mm}^2$ und die modifizierte Bielschowsky-Methode mit 2 Plaques/ $6,25 \text{ mm}^2$ im geometrischen Mittel (Abb. 7).

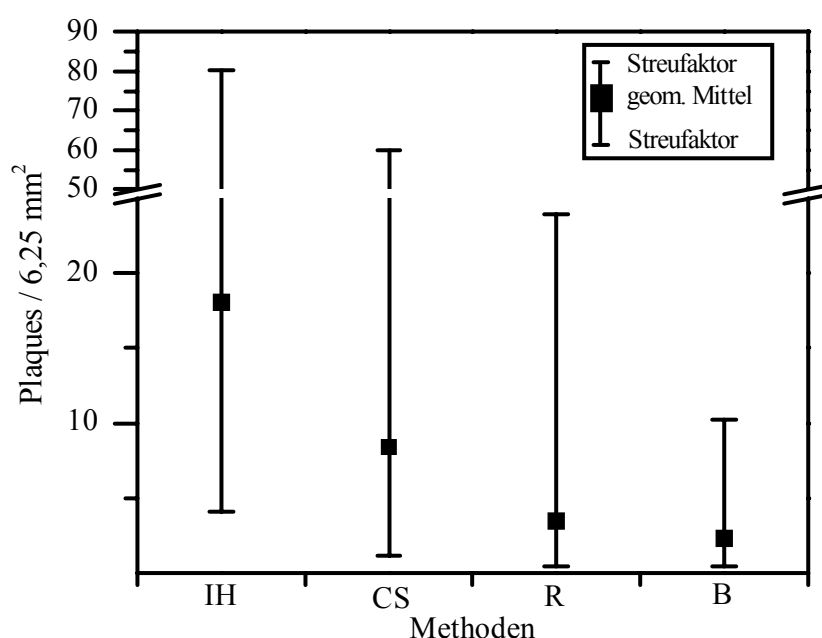


Abbildung 7: Nachweis von Plaques mittels Immunhistologie sowie drei Silberfärbungen bei 30 alten Hunden (Gruppe 3, 10-18 Jahre). IH = Immunhistologie, CS = Campbell-Switzer, R = Reusche, B = Bielschowsky

Der kleinste Wert lag für alle Methoden bei $0,5 \text{ Plaques}/6,25 \text{ mm}^2$ und die maximalen Zählwerte lagen für die Immunhistologie bei $250 \text{ Plaques}/6,25 \text{ mm}^2$, für die Campbell-Switzer-Methode bei $200 \text{ Plaques}/6,25 \text{ mm}^2$, für die Reusche-Methode bei $116 \text{ Plaques}/6,25 \text{ mm}^2$ und für die modifizierte Bielschowsky-Methode bei $42 \text{ Plaques}/6,25 \text{ mm}^2$. Mittels der modifizierten Bodian-Methode zeigten sich vereinzelte, schlecht erkennbare Plaques und mittels der Gallyas-Methode gar keine Plaques. In die weiterführende statistische Auswertung wurden diese zwei Methoden nicht miteinbezogen. Es ergaben sich in einer einfaktoriellen Varianzanalyse statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Methoden ($p = 0,0001$). Im

Anschluß wurde aufgrund signifikanter Unterschiede zwischen den Methoden der Student-Newman-Keuls-Test durchgeführt. Es ergaben sich auch hier signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden ($p = 0,01$).

4.2.3.1 Clusteranalyse

Die Zählung der mittels Immunhistologie nachweisbaren Plaques machte weiterhin deutlich, daß die Plaquedichte in den Gehirnen der alten Hunde individuell sehr unterschiedlich ist und von einem bis zu 149 Plaques/6,25 mm² im arithmetischen Mittel schwankt. Bei den alten Hunden konnte keine altersabhängige stetige Zunahme der Plaqueanzahl gefunden werden. Beispielsweise fanden sich bei zwei 10jährigen Hunden 127 und 148 Plaques/6,25 mm² im arithmetischen Mittel und bei den drei 16jährigen Hunden nur 1 bis 11 Plaques/6,25 mm² (Abb. 8). Mittels eines statistischen Verfahrens, der Clusteranalyse (Deichsel und Trampisch, 1985), konnten drei Gruppen aufgezeigt werden: 5 Hunde mit niedriger (12-16 Jahre), 14 Hunde mit mittlerer (11-16 Jahre) und 11 Hunde mit hoher Plaquedichte (10-18 Jahre), wobei sich Grenzen bei ca. 2,5 und bei 40 Plaques/6,25 mm² fanden (Abb. 9).

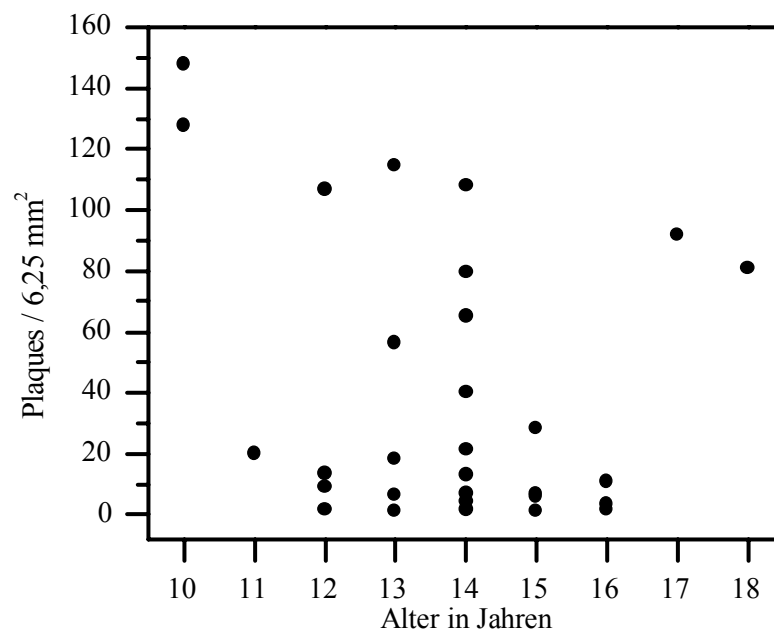


Abbildung 8: Immunhistologisch bestimmte individuelle Plaquedichten bei 30 alten Hunden (Gruppe 3, 10-18 Jahre).

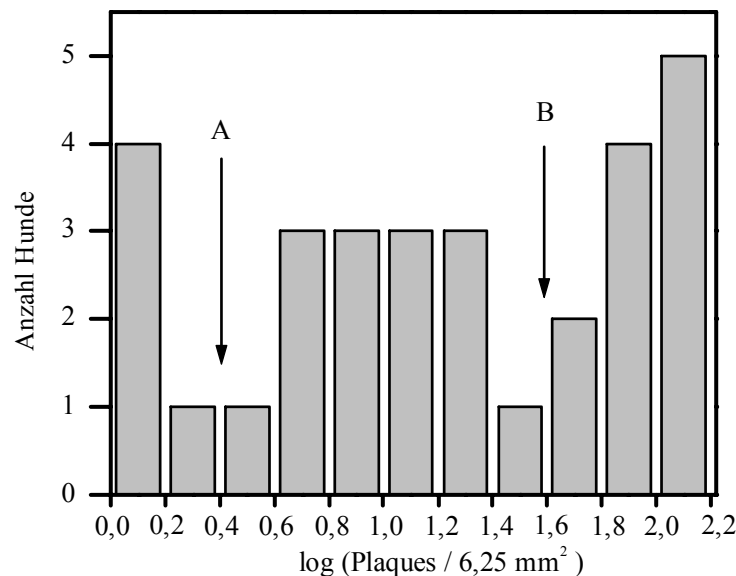


Abbildung 9: Einteilung der 30 alten Hunde (Gruppe 3, 10-18 Jahre) in drei unterschiedliche Cluster in Abhängigkeit von der individuellen Plaquedichte. Die Grenzen der drei Cluster liegen bei 2,5 Plaques/6,25 mm² (Pfeil A) und 40 Plaques/6,25 mm² (Pfeil B).

4.3 Pathologisch-histologische Untersuchung des Gehirns

4.3.1 Übersichtsauswertung

Die Gehirne aller Hunde (1 Monat bis zu 18 Jahren) wurden mittels HE-Färbung einer histologischen Übersichtsauswertung unterzogen. In den Gehirnen von vier Hunden (Nr. 64, 76, 83, 123, *Tab. 4, Anhang 9.4*) fanden sich Metastasen eines Lymphosarkoms, Hämangiosarkoms, eines anaplastischen Mammakarzinoms und eines Prostatakarzinoms. Zwei Hunde (Nr. 78, 117) wiesen einen stark erhöhten Zellgehalt unklarer Ursache in der weißen (Nr. 78) und in der grauen Substanz (Nr. 117) auf. Immunhistologische Untersuchungen dieser Schnitte zum Nachweis von Staupevirus-Antigen, CD3- und MHC Klasse II-Antigen-positiver Zellen verliefen mit negativem Ergebnis.

4.3.2 Altersabhängige pathologisch-histologische Gehirnveränderungen

Darüber hinaus wurden die Gehirne von aus 138 Hunden ausgewählten **jungen Hunden** (Gruppe 1, 2-3 Jahre, n = 5) und **alten Hunden ohne Plaques** (Gruppe 2, 11-14 Jahre, n = 5) und **alten Hunden mit Plaques** (Gruppe 3, 10-18 Jahre, n = 30) einer weiterführenden

Beurteilung und semiquantitativen Auswertung altersabhängiger Veränderungen, wie z.B. Fibrose der Meninx und des Plexus chorioideus, des Lipofuszingehaltes von Neuronen und perivaskulären Makrophagen, Mikroblutungen in der grauen Substanz und Sphäroiden in der weißen Substanz, unterzogen.

4.3.2.1 Junge Hunde

Die Gehirne der **jungen Hunde** (Gruppe 1, 2-3 Jahre) wiesen keine besonderen Veränderungen auf. Die Meningen und der Plexus chorioideus waren ohne besonderen Befund. In den Neuronen der Großhirnrinde konnte kein Lipofuszin nachgewiesen werden. Es fanden sich keine perivaskulär gelegenen Lipofuszin-haltigen Makrophagen in der grauen und der weißen Substanz. Bei keinem der Hunde traten Mikroblutungen im Neuropil auf. In der weißen Substanz fanden sich keine Sphäroide und keine sogenannten eosinophilen Kügelchen.

4.3.2.2 Alte Hunde ohne und mit Plaques

Bei 100% der **alten Hunde ohne Plaques** (Gruppe 2, 11-14 Jahre) lag eine Fibrose der Meninx, die sich durch Zunahme der kollagenen Fasern und Fibrozyten in der Leptomeninx auszeichnet, vor. Daneben fand sich bei 60% der Hunde eine Fibrose des Plexus chorioideus. Die Neuronen in der Großhirnrinde wiesen bei allen Hunden eine Speicherung des Alterungspigments Lipofuszin auf. Dieses Pigment stellt sich als grün-gelbliches, feingranuläres Material dar und lag im Zytoplasma der Neuronen. Besonders deutlich zeigte sich dieses Pigment in den großen Pyramidenzellen. Perikapilläre Mikroblutungen in der grauen Substanz traten bei keinem der Hunde ohne Plaques auf. Weiterhin fanden sich in grauer und weißer Substanz perivaskulär gelegene, Lipofuszin-haltige Makrophagen. In der weißen Substanz konnten bei zwei Hunden (Nr. 91, 106, *Tab. 4*) vereinzelt Sphäroide festgestellt werden. Drei Hunde (Nr. 56, 91, 106, *Tab. 4*) wiesen vereinzelt eosinophile Kügelchen, die keiner morphologischen Struktur eindeutig zuzuordnen waren, zwischen den Axonen der weißen Substanz auf. In den Gehirnen der **alten Hunde mit Plaques** (Gruppe 3, 10-18 Jahre) trat bei 97% eine Meninxfibrose auf (*Abb. 53*). 100% der Hunde zeigten eine Fibrose des Plexus chorioideus (*Abb. 54*). In der Großhirnrinde lag bei 97% der Hunde Lipofuszin im Zytoplasma der Neuronen vor (*Abb. 55a und 55b*). Weiterhin traten bei allen Hunden perivaskulär gelegene, Lipofuszin-haltige Makrophagen in grauer (*Abb. 56*) und weißer Substanz (*Abb. 57*) auf. 63% der alten Hunde mit Plaques zeigten in der grauen Substanz einzelne perikapilläre Mikroblutungen (*Abb. 58*). In der weißen Substanz wiesen 63% der

Hunde vereinzelte Sphäroide auf (*Abb. 59-62*). Zwischen den Axonen fanden sich bei 57% der Hunde sogenannte eosinophile Kügelchen (*Abb. 63a-63d*).

4.3.3 Statistische Auswertung

Im Rahmen des statistischen Gruppenvergleichs (Kruskal-Wallis-Test, Fisher-Test) fanden sich, bezogen auf die Meninxfibrose ($p = 0,0012$), die Fibrose des Plexus chorioideus ($p = 0,0333$), Lipofuszinablagerungen in Neuronen ($p = 0,0016$) sowie perivaskulären Zellen ($p = 0,0015$) und Mikroblutungen ($p = 0,0028$) signifikante altersabhängige Unterschiede zwischen den jungen Hunden (Gruppe 1, 2-3 Jahre) und den alten Hunden ohne und mit Plaques (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre); es traten aber darüber hinaus nur bezüglich der Mikroblutungen Unterschiede zwischen den alten Hunden ohne (Gruppe 2, 11- 14 Jahre) und den alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) auf.

4.4 Klinik

Im Rahmen der Untersuchungen wurde der Versuch unternommen, anamnestische Daten über bestimmte Verhaltensänderungen und sogenannte „kognitive Dysfunktionen“, die bei alten Hunden möglicherweise auftreten, zu erhalten. Hierfür wurde ein selbsterstellter Fragebogen (siehe Anhang) in Anlehnung an Kiatipattanasakul et al. (1996) an die behandelnden Tierärzte und die Tierbesitzer ausgegeben. Von 10 Hunden (Nr. 63, 76, 77, 88, 94, 111, 113, 121, 122, 129, *Tab. 4*, 12-18 Jahre) lagen beantwortete Fragebögen vor. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in *Tab. 3* dargestellt. Die übrigen hier nicht aufgeführten Punkte aus dem Fragebogen wurden bei allen Hunden nicht mit ja oder nein beantwortet und gehen deshalb in diese Auflistung nicht mit ein.

Bei diesen 10 Hunden wiesen 100% eine Abnahme der Lebhaftigkeit, 90% zunehmende Bewegungsunlust, 20% zunehmenden Ungehorsam, 30% vermehrtes, unmotiviertes Bellen, 10% Desorientierung und Verlust erlernter Fähigkeiten, 30% zunehmende nächtliche Unruhe, 20% Urininkontinenz, 10% zunehmende Gleichgültigkeit gegenüber der Umwelt, 40% Zurückziehen aus der gewohnten Umgebung, 10% Rast-und Ruhelosigkeit, 20% ein gesteigertes Schlafbedürfnis am Tag, 10% Angst und Schreckhaftigkeit und Starren in eine Ecke auf. Telefonisches Nachfragen bei den behandelnden Tierärzten im Fall nicht beantworteter Fragebögen erbrachte, daß die meisten alten Hunde plötzlich mit den klinischen Anzeichen eines akuten Herz-Kreislaufversagens, d.h. in Seitenlage und hechelnd, vorgestellt wurden, ohne daß vorher deutliche Wesensveränderungen aufgetreten waren. Leider konnte so für die

4.5 Nachweis des β A4-Proteins in Plaques und Gefäßen

4.5.1 Alters-, geschlechts- und rasseabhängiges Auftreten

4.5.1.1 Alter

Immunhistologisch konnte bei insgesamt 80 von 138 Hunden im Alter von 1 Monat bis zu 18 Jahren β A4-Protein in der Großhirnrinde nachgewiesen werden. Von diesen 80 Hunden mit β A4-Proteinablagerungen wiesen fünf Hunde nur Plaques ohne Gefäßablagerungen auf. Diese Hunde waren zwischen 8 und 12 Jahren alt. Acht Hunde im Alter von 9 bis 14 Jahren zeigten nur β A4-Proteinablagerungen in meningealen und parenchymalen Gefäßen, und 67 Hunde im Alter zwischen 8 bis zu 18 Jahren wiesen Plaques in Kombination mit β A4-Proteinablagerungen in meningealen und/oder parenchymalen Gefäßen auf. Die Anzahl der Hunde in jeder Alterstufe mit dem jeweiligen individuellen Befund, d.h. nur Plaques, nur Amyloidangiopathie oder Plaques in Kombination mit einer Amyloidangiopathie, sind in *Abb. 10* zusammengefaßt dargestellt.

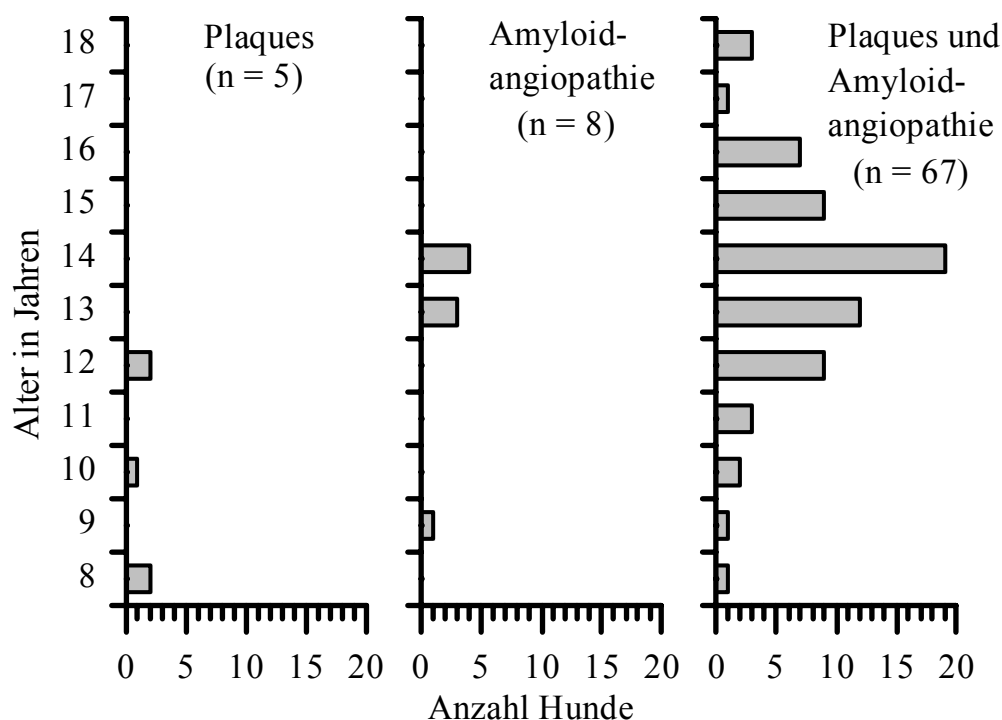


Abbildung 10: Altersverteilung von Hunden, die nur Plaques, nur eine Amyloidangiopathie oder beide Merkmale aufweisen (n = Anzahl der Hunde).

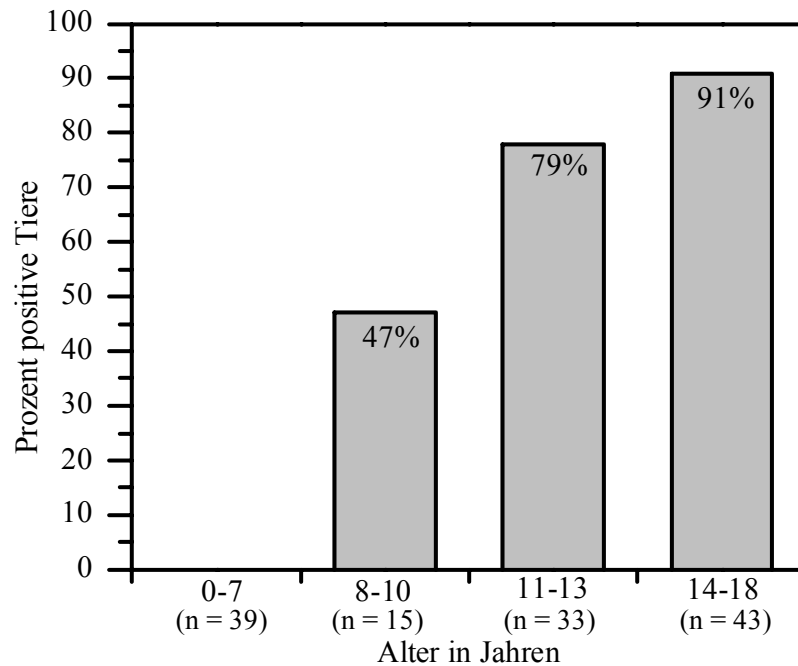


Abbildung 11: Immunhistologischer Nachweis von Plaques im Gehirn von Hunden im Alter von einem Monat bis zu 18 Jahren (n = Anzahl der Hunde).

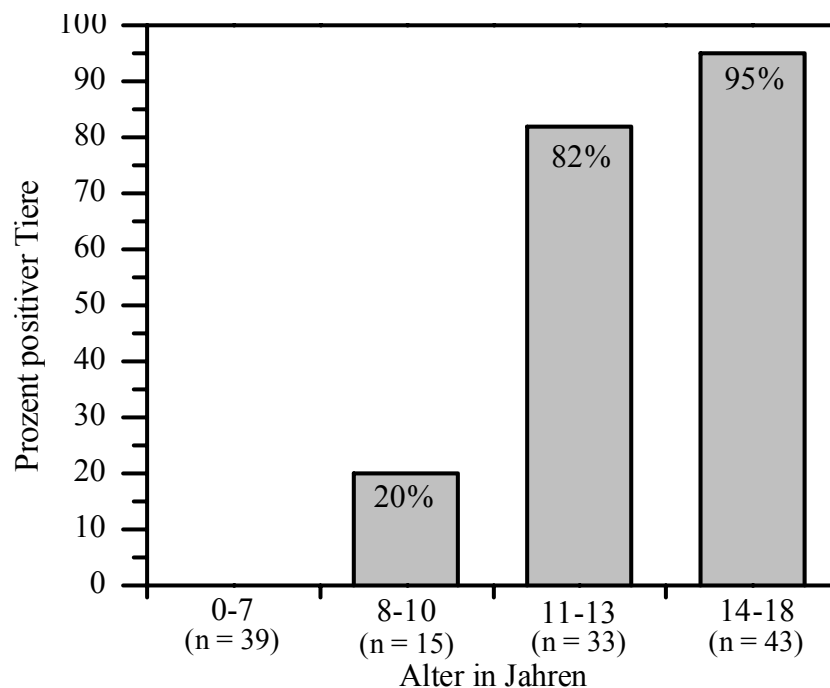


Abbildung 12: Immunhistologischer Nachweis von β A4-Proteinablagerungen in den meningealen Gefäßen von Hunden im Alter von einem Monat bis zu 18 Jahren (n = Anzahl der Hunde).

Erstmals traten **Plaques** bei einem 8jährigen Hund auf. Wie *Abb. 11* zeigt, fand sich eine altersabhängige Zunahme des Prozentsatzes Plaque-positiver Hunden. Bei den 8 bis 10jährigen Hunden fanden sich bei 47%, bei den 11 bis 13jährigen Hunden bei 79% und bei den 14

bis 18jährigen Hunden bei 91% der Hunde Plaques. Auch **statistische Untersuchungen** (logistische Regression) bestätigten, daß das Auftreten der Plaques ein signifikant altersabhängiger Prozeß war ($p = 0,0001$).

Insgesamt wiesen 71 Hunde β A4-Proteinablagerungen in den **meningealen Gefäßen** auf. Immunhistologisch nachweisbare β A4-Proteinablagerungen traten auch hier erstmals bei einem 8jährigen Hund auf. Eine altersabhängige Zunahme des Prozentsatzes von Hunden, die β A4-Proteinablagerungen in den meningealen Gefäßen aufwiesen, wird aus *Abb. 12* deutlich. 20% der 8 bis 10jährigen Hunde, 82% der 11 bis 13jährigen und 95% der 14 bis 18jährigen Hunde wiesen β A4-Proteinablagerungen in den meningealen Gefäßen auf. Bei 69 Hunden traten β A4-Proteinablagerungen in den **parenchymalen Kapillaren** der grauen Substanz auf. Auch hier zeigten sich die Ablagerungen erstmals bei einem 8jährigen Hund. Bei den 8 bis 10jährigen Hunden fanden sich bei 53% der Hunde, bei den 11 bis 13jährigen bei 70% der Hunde und bei den 14 bis 18jährigen Hunden bei 98% der Hunde β A4-Proteinablagerungen in den parenchymalen Kapillaren der grauen Substanz (*Abb. 13*). In **statistischen Untersuchungen** (Korrelationsanalyse) konnte eine signifikante Altersabhängigkeit des Auftretens von β A4-Proteinablagerungen in den meningealen Gefäßen ($r_s = 0,8399$, $p = 0,001$) und den parenchymalen Kapillaren ($r_s = 0,8174$, $p = 0,001$) bestätigt werden.

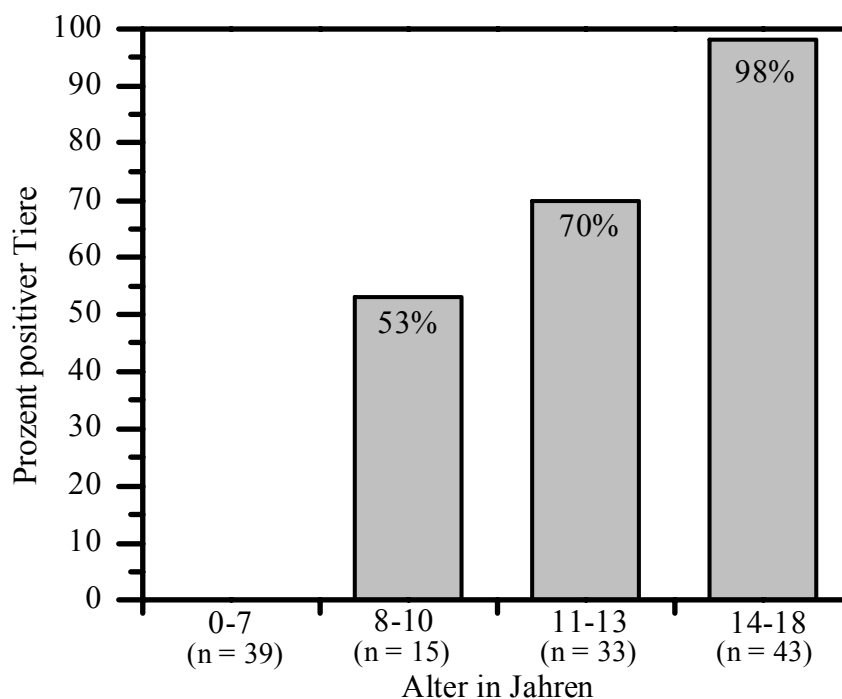


Abbildung 13: Immunhistologischer Nachweis von β A4-Proteinablagerungen in Kapillaren der grauen Substanz bei Hunden im Alter von einem Monat bis zu 18 Jahren. (n = Anzahl der Hunde)

Im **Hippocampus** traten bandartige β A4-Proteinablagerungen im Stratum moleculare erstmals bei einem 10jährigen Hund auf. Wie in *Abb. 14* dargestellt, traten diese Ablagerungen bei 15% der 8 bis 10jährigen Hunde, bei 74% der 11 bis 13jährigen und bei 79% der 14 bis 18jährigen Hunde auf. In **statistischen Untersuchungen** (logistische Regression) wurde das signifikant altersabhängige Auftreten der β A4-Proteinablagerungen im Hippocampus bestätigt ($p = 0,0001$).

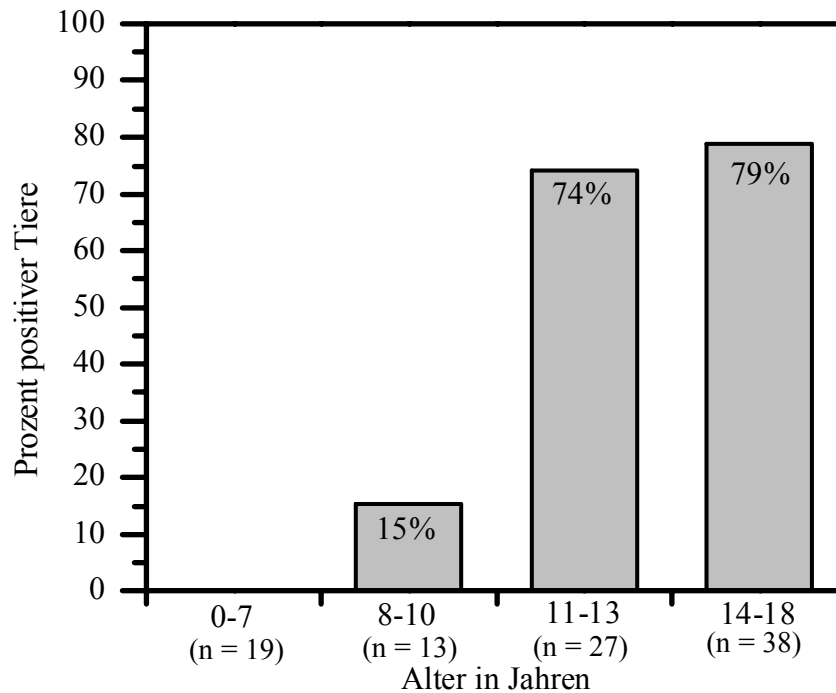


Abbildung 14: Immunhistologischer Nachweis von β A4-Proteinablagerungen im Stratum moleculare des Hippocampus bei Hunden im Alter von einem Monat bis zu 18 Jahren. (n = Anzahl der Hunde)

4.5.1.2 Geschlecht und Rasse

Bei den 72 Hunden, die Plaques aufwiesen (67 Hunde mit einer Kombination aus Plaques und Gefäßablagerungen und 5 Hunde mit Plaques ohne Gefäßablagerungen), lag folgende **Geschlechterverteilung** vor: 39 männliche, 35 weibliche, 9 männlich-kastrierte und 8 weiblich-kastrierte Hunde. Bei den männlichen Hunden zeigten 84%, bei den weiblichen Hunde 68%, bei den männlich-kastrierten 88% und den weiblich-kastrierten Hunden 87% Plaques. In einer **statistischen Untersuchung** (logistische Regression) konnte keine geschlechtsspezifisch gehäuftes Auftreten von Plaques bei männlichen oder weiblichen Hunden gefunden werden. Bezüglich der **Rassenverteilung** fand sich, daß von insgesamt im

Untersuchungsgut vorliegenden 93 Rassehunden 46% Plaques und von den 45 Mischlingen 64% Plaques hatten. Eine **statistische Untersuchung** (Chi-Quadrat-Test) zeigte, daß die Mischlinge signifikant häufiger Plaques aufwiesen als Rassehunde ($p = 0,045$).

4.5.2 Morphologie der β A4-Proteinablagerungen in Plaques und Gefäßen

4.5.2.1 Plaques

Die Plaques in der Großhirnrinde lagen teils frei im Neuropil und teils um Neuronen angeordnet vor. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe wurden die Plaques in zwei Typen unterteilt. Der **Typ 1-Plaque** stellte sich immunhistologisch als kondensiertes, relativ gut begrenztes, β A4-Protein-positives, braunes Signal dar (*Abb. 64*). Diese Typ 1-Plaques waren unterschiedlich groß, wiesen einen Durchmesser von ca. 30 μ m bis zu 150 μ m auf und fanden sich in den Kortexschichten 2 bis 4, aber nicht in der ersten Großhirnschicht, dem Stratum moleculare sowie Kortexschicht 5 und 6. Morphologisch ähnelt dieser Plaquetyp des Hundes den diffusen Plaques des Menschen. Der **Typ 2-Plaque** war gekennzeichnet durch ein großflächig-wolkiges, weniger kondensiertes, teils aufgelockertes β A4-Protein-positives Signal (*Abb. 65*), das sich häufig entlang der gesamten Großhirnwindungen und -furchen entlang zog. Dieser Typ 2-Plaque fand sich in den tiefen Kortexschichten 5 und 6 am Übergang zur weißen Substanz.

Die zwei Plaquetypen traten in zwei laminären Verteilungsmustern im Kortex auf. Das **Muster 1** wies eine Kombination der Typ 1-Plaques in den oberen Kortexschichten mit den Typ 2-Plaques in den tiefen Kortexschichten auf (*Abb. 66*). **Muster 2** war charakterisiert durch das alleinige Auftreten von Typ-2-Plaques in den tiefen Großhirnschichten (*Abb. 67*). In diesem Zusammenhang hatte die immunhistologische Untersuchung von 8 Gehirnebenen bei 12 Hunden (siehe 3.2.3) gezeigt, daß sich in Abhängigkeit von der Schnittebene die Ausprägung des jeweiligen Verteilungsmusters ändern kann. Aufgrund dieser Tatsache wurde auf eine weitergehende Unterteilung der laminären Verteilungsmuster verzichtet.

Bei den 72 Hunden mit Plaques fand sich folgende prozentuale Verteilung der Muster 1 und 2: 43% der Hunde wiesen Muster 1 und 57% der Hunde Muster 2 auf. Die prozentuale Verteilung von Muster 1 und 2 in der jeweiligen **Altersklasse** ist in *Abb. 15* zusammenfassend dargestellt. Bei den 8 bis 10jährigen Hunden wiesen 43% Muster 1 und 57% Muster 2 auf. Bei den 11 bis 13jährigen Hunden trat bei 50% der Tiere Muster 1 und bei 50% der Tiere Muster 2 auf. Bei den sehr alten Hunden im Alter von 14 bis 18 Jahren wiesen 38% Muster 1

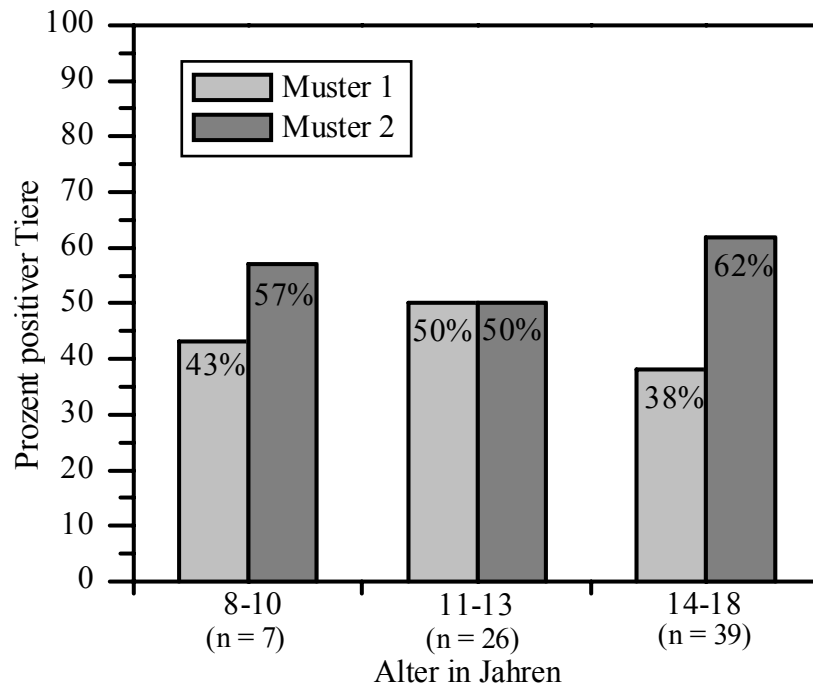


Abbildung 15: Altersabhängigkeit des Auftretens von Muster 1 und Muster 2. (n = Anzahl der Hunde)

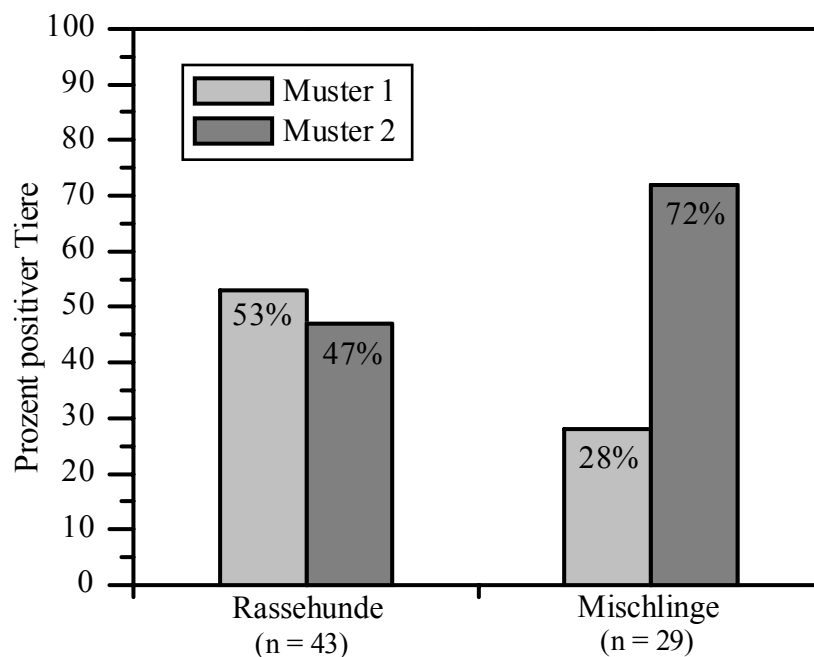


Abbildung 16: Rasseabhängigkeit des Auftretens von Muster 1 und Muster 2. (n = Anzahl der Hunde)

und 62% Muster 2 auf. Eine statistisch Untersuchung (Regressionsanalyse) zeigte eine signifikante altersabhängige Zunahme des Muster 2 ($p = 0,0001$). Bezüglich der **Geschlechtsverteilung** wiesen die männlichen Hunde zu 42% Muster 1 und zu 58% Muster 2 auf; die männlich-kastrierten Hunde zeigten zu 38% Muster 1 und zu 62% Muster 2. Die weiblichen Hunde zeigten zu 48% Muster 1 und zu 52% Muster 2; weiblich-kastrierte Hunde wiesen zu

33% Muster 1 und zu 67% Muster 2 auf. Hinsichtlich der **Hunderassen** trat bei den 43 Rassehunden zu 53% Muster 1 und zu 47% Muster 2 und bei den 29 Mischlingen zu 28% Muster 1 und zu 72% Muster 2 auf (*Abb. 16*). Eine statistische Untersuchung (Chi-Quadrat-Test) zeigte, daß die Mischlinge signifikant häufiger Muster 2 aufweisen ($p = 0,029$).

4.5.2.2 Gefäße

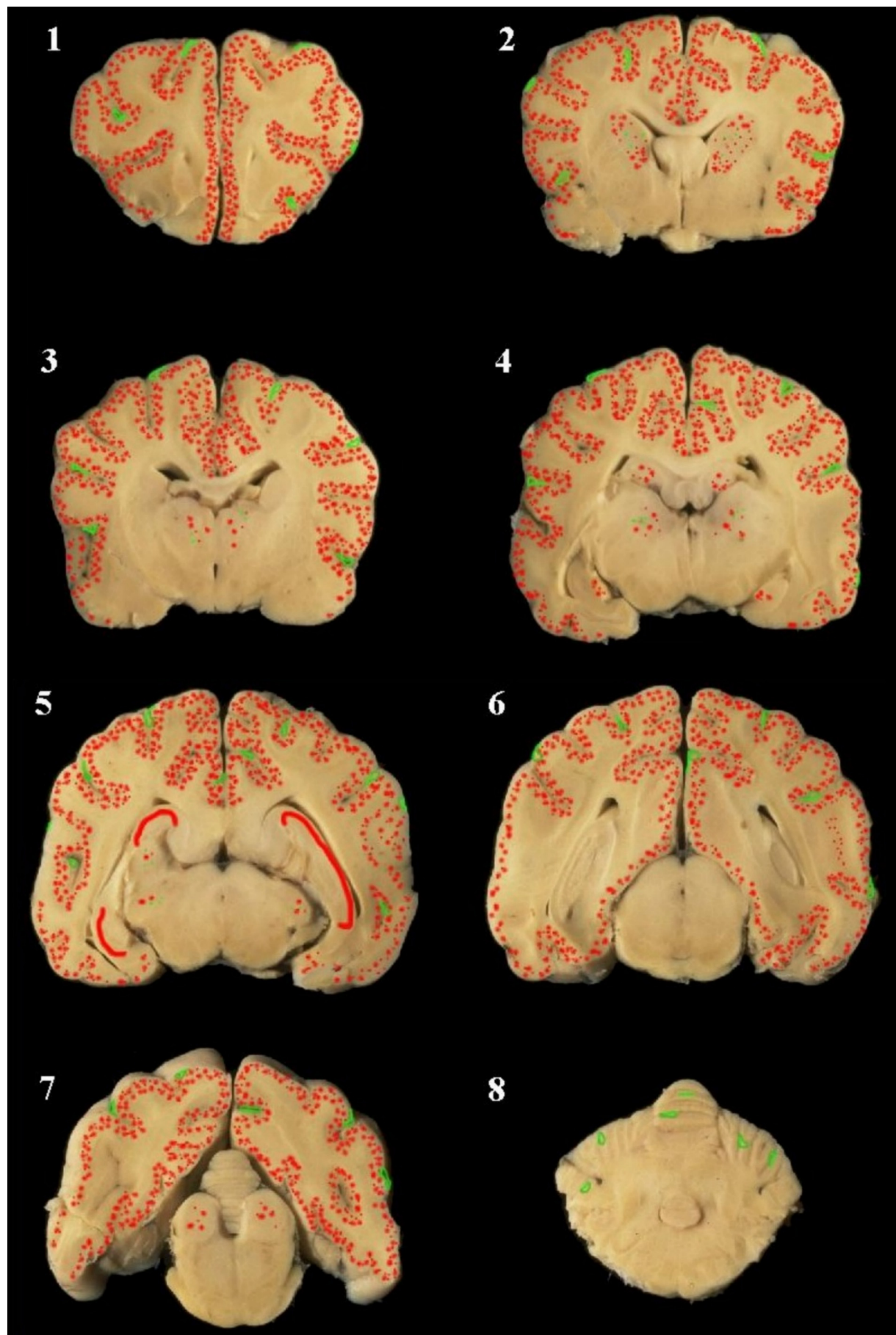
Die β A4-Proteinablagerungen in den **meningealen Gefäßen** waren in der Tunica media der Arterien lokalisiert und stellten sich hier als vollständig zirkuläres oder segmentales braunes, teils scholliges Signal dar (*Abb. 68*). Die Intensität dieser β A4-Proteinablagerungen nahm mit steigendem Alter der Hunde zu. Die β A4-Proteinablagerungen in den **parenchymalen Kapillaren** der Großhirnrinde waren gekennzeichnet durch ein vollständig zirkuläres, braunes Signal (*Abb. 69*). Interessanterweise lagen diese immunhistologisch positiven Kapillaren in herdförmigen Ansammlungen in den Kortexschichten 2 bis 4 und nicht gleichmäßig über die Gehirnwindungen und -furchen verteilt vor. Darüber hinaus wiesen diese β A4-Protein-positiven Kapillaren keine räumliche Korrelation zu den Plaques auf. Im Rahmen **statistischer Untersuchungen** (Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich nach Nemenyi und Korrelationsanalyse unter Angabe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman r_s), für die aber nur die Befunde der jungen (Gruppe 1, 2-3 Jahre) und alten Hunde (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) herangezogen wurden, konnte gezeigt werden, daß alte Hunde mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) mehr β A4-Proteinablagerungen in den meningealen Gefäßen aufwiesen als alte Hunde ohne Plaques ($p = 0,0112$). Bei den alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) fand sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Plaqueanzahl und der Intensität der gefäßassoziierten β A4-Proteinablagerungen ($r_s = 0,305$; $p = 0,075$).

4.5.3 Topographie

Acht Schnittebenen des Gehirns wurden von sechs Hunden mit einer hohen Plaquedichte (Nr. 71, 79, 88, 95, 98, 129, *Tab. 4*) und sechs Hunden mit einer geringen Plaquedichte (Nr. 64, 70, 114, 115, 117, 120, *Tab. 4*) immunhistologisch untersucht. Es zeigte sich, daß bei Hunden mit einer **hohen Plaquedichte**, wie dies in der *Abb. 17* beispielhaft gezeigt wird, die gesamten Großhirnrinde mit Lobus frontalis, temporalis, parietalis und occipitalis betroffen ist. Einige Plaques traten darüber hinaus in Stammhirnregionen, wie dem Nucleus caudatus, dem Putamen und dem Claustrum auf. Vereinzelt fanden sich Plaques im Thalamus, dem Corpus geniculatum laterale und mediale sowie den Colliculi inferior. Im Hippocampus lag

ein bandförmiges, diffuses Signal im Stratum moleculare vor. In der weißen Substanz traten keine β A4-Proteinablagerungen auf. In den meningealen Gefäßen des Groß- und Kleinhirns und in Kapillaren der grauen Substanz des Großhirns lagen begleitend β A4-Proteinablagerungen vor. Im Neuropil des Kleinhirns fanden sich nie β A4-Proteinablagerungen. Bei Hunden mit einer **geringer Plaquedichte** fanden sich diese im Lobus frontalis (Gyrus rectus, frontalis, coronalis, proreus) und Lobus parietalis (Gyrus cinguli, lateralis). Alle übrigen untersuchten Regionen waren bei diesen Tieren negativ.

Abbildung 17: (nächste Seite) Die acht untersuchten Schnittebenen der Hundegehirne. Schematisch dargestellt ist die Verteilung der Plaques in der Großhirnrinde und den Stammhirnregionen (rot), sowie beispielhaft die Lokalisation der gefäßassoziierten β A4-Proteinablagerungen in der Meninx und dem Neuropil (grün).



4.6 Nachweis des Amyloidvorläuferproteins

4.6.1 Junge Hunde

Die immunhistologische Darstellung des Amyloidvorläuferproteins ("amyloid precursor protein", APP) bei den **jungen Hunden** (Gruppe 1, 2-3 Jahre, n = 5) zeigte bei 100% der Tiere ein braunes, punktförmiges Signal in der Membran der Neuronen in der Großhirnrinde. Die meningealen Gefäße und parenchymalen Kapillaren waren negativ. In der weißen Substanz trat bei keinem der Hunde ein positives Signal auf. Ebenso erbrachte die Darstellung von Neurofilament bei den jungen Hunden keine Veränderungen in der weißen Substanz.

4.6.2 Alte Hunde

In den Gehirnen der **alten Hunde ohne Plaques** (Gruppe 2, 11-14 Jahre, n = 5) fand sich bei 60% der Hunde ein positives Signal in den Neuronen der grauen Substanz (*Abb. 70*). Die meningealen und die parenchymalen Gefäße waren bei allen Hunden negativ. In der weißen Substanz traten bei 80% der Hunde vereinzelte, unterschiedlich große APP-positive, braun gefärbte, kreisrunde oder längsovale Strukturen auf, die nach einer immunhistologischen Neurofilamentmarkierung von Folgeschnitten als Sphäroide interpretiert wurden.

In den Gehirnen der **alten Hunde mit Plaques** (Gruppe 3, 10-18 Jahre, n = 30) fand sich bei 97% der Hunde ein deutliches, punktförmiges, positives Signal in der Membran der Neuronen (*Abb. 71*). Die meningealen und die parenchymalen Gefäße waren bei allen Hunden negativ. In der weißen Substanz lagen bei 100% der Hunde runde, teils längsovale APP-positive Sphäroide in unterschiedlicher Menge vor (*Abb. 72a*). Die umliegenden, normal strukturierten Axone in der weißen Substanz waren bei allen Hunden APP-negativ. Die immunhistologische Darstellung von Neurofilament in Folgeschnitten entsprach hinsichtlich der Morphologie und Verteilung den Befunden der APP-Markierung (*Abb. 72b*). Bei drei alten Hunden (Nr. 78, 105, 123, *Tab.4*) traten diese APP-positiven Sphäroide sehr zahlreich auf. Die Ursache hierfür ist bei Hund Nr. 123 möglicherweise eine die umliegende weiße Substanz komprimierende Tumormetastase eines Prostatakarzinoms im Gehirn. Hund Nr. 78 wies einen Tumor der Pars intermedia der Hypophyse und einen erhöhten Zellgehalt in der weißen Substanz auf, der möglicherweise die Ursache ist für die zahlreichen Sphäroide in der weißen Substanz.

4.6.3 Statistische Auswertung

Es fanden sich in einem Gruppenvergleich (Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich nach Nemenyi) keine signifikanten Unterschiede in der neuronalen APP-Expression zwischen jungen (Gruppe 1, 2-3 Jahre) und alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre), also auch keine altersabhängige Zunahme der neuronalen APP-Expression. Allerdings konnte eine signifikant höhere, neuronale APP-Expression bei alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) als bei alten Hunden ohne Plaques (Gruppe 2, 11-14 Jahre) festgestellt werden ($p = 0,0128$). Weiterhin fand sich (Korrelationsanalyse) bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der Plaquedichte und der neuronalen APP-Expression ($r_s = 0,3957$, $p = 0,0186$), d.h. in Verbindung mit einer hohen Plaquedichte tritt auch eine starke neuronale APP-Expression auf. Hinsichtlich der APP-positiven Sphäroide in der weißen Substanz zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den jungen (Gruppe 1, 2-3 Jahre) und den alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) ($p = 0,0011$). Es fand sich bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) kein Unterschied zwischen denen mit und ohne Plaques. Darüber hinaus konnte kein Zusammenhang mit der Plaquedichte aufgezeigt werden. Die Neurofilamentmarkierung bestätigte die signifikante altersabhängige Zunahme der Sphäroide in der weißen Substanz ($p = 0,0343$); zwischen den alten Hunden mit und ohne Plaques (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) gab es keine Unterschiede.

4.7 Nachweis aktivierter Gliazellen

4.7.1 MHC Klasse II-positive Mikrogliazellen

4.7.1.1 Junge Hunde

Die immunhistologische Darstellung des MHC Klasse II-Antigens auf Mikrogliazellen erfolgte an Gefriermaterial von 8 **jungen Kontrollhunden** (Nr. 131-138, 9 Monate, *Tab. 4*) aus einer Toxizitätsstudie. Bei diesen Hunden war die Anzahl MHC Klasse II-positiver Mikrogliazellen in der grauen und weißen Substanz gering. Die Zellen waren regelmäßig in grauer und weißer Substanz verteilt, und es fanden sich mehr Mikrogliazellen in der weißen (60 bis zu 880 Zellen/6,25 mm²) als in der grauen Substanz (20 bis zu 120 Zellen/6,25 mm²). Die Mikrogliazellen in der grauen und weißen Substanz hatten einen kleinen Zellkörper mit wenig Zytoplasma und kurzen Zellausläufern (*Abb. 73a und 73b*).

4.7.1.2 Alte Hunde

In der Gruppe der **alten Hunde ohne Plaques** (Gruppe 2, 11-14 Jahre) lag nur von zwei Tieren (Nr. 106, 109, *Tab. 4*) und in der Gruppe der **alten Hunde mit Plaques** (Gruppe 3, 10-18 Jahre) von 12 Tieren (Nr. 67, 71, 92, 98, 105, 112, 115, 117, 121, 123, 127, 129, *Tab. 4*) Gefriermaterial vor. Bei den alten Hunden wurden Mikrogliazellen regelmäßig verteilt in der grauen und weißen Substanz nachgewiesen. In der weißen Substanz (1120 bis zu 2040/6,25 mm²) zeigten sich mehr Mikrogliazellen als in der grauen Substanz (100 bis zu 520/6,25 mm²). Die Mikrogliazellen in grauer und weißer Substanz wiesen einen großen Zelleib und lange Zellausläufer auf (*Abb. 74a und 74b*).

4.7.1.3 Statistische Auswertung

Im Gruppenvergleich (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) zeigten die alten Hunde (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) eine signifikante altersabhängige Zunahme MHC Klasse II-positiver Mikrogliazellen in der grauen ($p = 0,0003$) und in der weißen ($p = 0,0001$) Substanz der Großhirnrinde. Darüber hinaus trat (Korrelationsanalyse) ein positiver Zusammenhang zwischen der Plaquedichte in der grauen Substanz und der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen in der weißen Substanz auf ($p = 0,029$). Die *Abb. 18* zeigt für die alten Hunde (Gruppe 3, 10-18 Jahre) die Zunahme der aktivierten Mikroglia in Abhängigkeit von der Plaquedichte. Ein Zusammenhang zwischen der Plaquedichte und der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen in der grauen Substanz trat nicht auf ($p = 0,367$). Eine Korrelation (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) der Mikrogliaanzahl in der weißen Substanz mit den unterschiedlichen laminären Verteilungsmustern fand sich in der Form, daß Hunde mit dem Muster 2 weniger Mikrogliazellen (arithmetisches Mittel: 1155 Zellen/6,25 mm²) aufwiesen als Hunde mit Muster 1 (arithmetisches Mittel: 1702 Zellen/6,25 mm²) ($p = 0,0172$), wobei zu berücksichtigen ist, daß die Hunde mit Muster 2 hier im Durchschnitt 6 Plaques/6,25 mm² und Hunde mit Muster 1 53 Plaques/6,25 mm² aufwiesen.

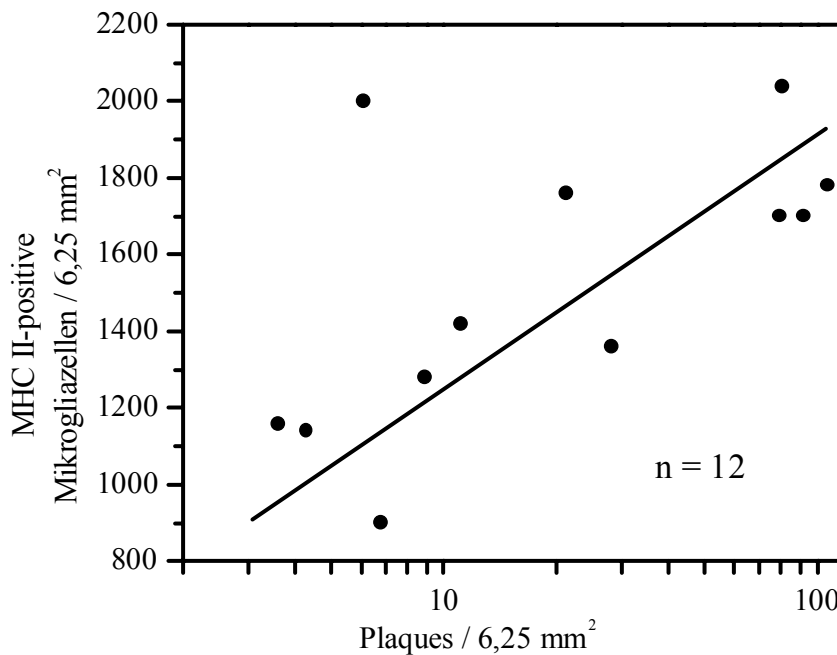


Abbildung 18: Abhängigkeit der MHC II-positiven Mikrogliazellen in der weißen Substanz von der Plaquedichte der grauen Substanz. Die eingezeichnete Regressionsgerade zeigt den Zusammenhang zwischen der Mikrogliazelldichte und der Plaquedichte. (n = Anzahl der Hunde)

4.7.2 BS-1-positive Zellen

4.7.2.1 Junge Hunde

Die **jungen Hunde** (Gruppe 1, 2-3 Jahre, n = 5) wiesen in der grauen und weißen Substanz der Großhirnrinde vereinzelte, perivaskulär gelegene BS-1-positive Zellen auf, die sich durch ein großblasiges Zytoplasma auszeichneten (*Abb. 75a und 75b*). Weiterhin fand sich ein schwaches, positives Signal in den Endothelzellen meningealer Gefäße und der Kapillaren in grauer und weißer Substanz.

4.7.2.2 Alte Hunde

In den Gehirnen der alten **Hunde ohne Plaques** (Gruppe 2, 11-14 Jahre, n = 5) traten in der grauen Substanz perivaskuläre BS-1-positive Zellen in geringer Menge auf. Die Endothelzellen meningealer und parenchymaler Gefäße zeigten ein schwach positives Signal. In der weißen Substanz lagen die perivaskulär gelegenen BS-1-positiven Zellen in mittlerer bis großer Menge vor. In den Gehirnen der **alten Hunde mit Plaques** (Gruppe 3, 10-18 Jahre, n = 30) fanden sich bei allen Tieren BS-1-positive Zellen mit großblasigem Zytoplasma in geringer bis mittlerer Menge im perivaskulären Raum in der grauen Substanz (*Abb. 76a*). Im Gehirn eines Hundes (Nr. 117) traten in der grauen Substanz zahlreiche BS-1-positive Zellen

auf. Die Ursache hierfür ist bei diesem Tier eine Polioenzephalitis unklarer Ursache. Die Endothelzellen der meningealen Gefäße und der Kapillaren wiesen ein schwaches, positives Signal auf. In der weißen Substanz zeigten alle Hunde perivaskuläre BS-1-positive Zellen in mittlerer bis großer Menge (*Abb. 76b*).

4.7.2.3 Statistische Auswertung

Es zeigte sich im Gruppenvergleich (Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich nach Nemenyi) bei den alten (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) im Vergleich zu den jungen Hunden (Gruppe 1, 2-3 Jahre) eine signifikante altersabhängige Zunahme der BS-1-positiven Zellen in der grauen ($p = 0,005$) und der weißen Substanz ($p = 0,0027$) des Großhirns. Allerdings traten bei den alten Hunden zwischen Gruppe 2 und 3 keine Unterschiede auf, und es konnte kein Zusammenhang (Korrelationsanalyse) zwischen der Plaque-dichte und der Anzahl BS-1-positiver Zellen in grauer und weißer Substanz aufgezeigt werden.

4.7.3 GFAP- und Vimentin-positive Zellen

4.7.3.1 Junge Hunde

In den Gehirnen der **jungen Hunde** (Gruppe 1, 2-3 Jahre, $n = 5$) fanden sich in der grauen Substanz GFAP-positive Astrozyten überwiegend subpial im Stratum moleculare (Lamina limitans gliae superficialis), um die Kapillaren (Lamina limitans gliae perivascularis) und im Neuropil auf. Die Zellen wiesen im Zytoplasma wenig saures Gliafaserprotein und sehr schmale Zellfortsätze auf (protoplasmatische Astrozyten) (*Abb. 77a*). In der weißen Substanz (440 bis zu 700 Zellen/6,25 mm²) traten die Astrozyten zahlreicher auf als in der grauen Substanz (100 bis zu 440 Zellen/6,25 mm²). Die Zellen in der weißen Substanz zeigten mehr saures Gliafaserprotein im Zytoplasma und lange, sehr breite Zellfortsätze (fibröse Astrozyten) (*Abb. 77b*). Immunhistologische Untersuchungen zur Darstellung Vimentin-positiver Astrozyten verliefen mit negativem Ergebnis. Es trat nur ein schwach positives Signal in den Endothelzellen der meningealen Gefäße und parenchymalen Kapillaren der grauen Substanz auf.

4.7.3.2 Alte Hunde

In den Gehirnen der **alten Hunde ohne Plaques** (Gruppe 2, 11-14 Jahre, $n = 5$) fanden sich in der grauen Substanz GFAP-positive Astrozyten subpial im Stratum moleculare der

Großhirnrinde (Membrana limitans gliae superficialis), perivaskulär um die Kapillaren (Membrane limitans gliae perivascularis) und im Neuropil. Die Astrozyten in der grauen Substanz wiesen relativ wenig saures Gliafaserprotein im Zytoplasma und lange, dünne Zellausläufer auf (protoplasmatische Astrozyten). In der weißen Substanz (280 bis zu 720 Zellen/6,25 mm²) lagen insgesamt mehr Astrozyten vor als in der grauen Substanz (200 bis zu 460 Zellen/6,25 mm²). In der weißen Substanz fanden sich GFAP-positive Astrozyten zwischen den Axonen und zahlreiche Astrozytenausläufer um die Gefäße. Zwei Hunde (Nr. 56, 106) wiesen eine höhere Anzahl von Astrozyten im Grenzbereich von weißer zu grauer Substanz (Assoziationsfasern) auf als in der Mitte der weißen Substanz. Die Astrozyten in der weißen Substanz zeigten einen hohen Gehalt an saurem Gliafaserprotein im Zytoplasma und somit einen sehr großen, prominenten Zelleib und breite, lange Zellfortsätze. Immunhistologische Untersuchungen zur Darstellung Vimentin-positiver Astrozyten verliefen mit negativem Ergebnis. In den Gehirnen der **alten Hunde mit Plaques** (Gruppe 3, 10-18 Jahre, n = 30) traten in der weißen Substanz (340 bis zu 1120 Zellen/6,25 mm²) zahlreichere Astrozyten auf als in der grauen Substanz (140 bis zu 820 Zellen/6,25 mm²). Die topografische Verteilung entsprach der in den Gehirnen der Hunde aus Gruppe 2. Die Astrozyten der grauen Substanz waren kleiner, wiesen feinere Zellausläufer auf als die Astrozyten in der weißen Substanz (*Abb. 78a*). Diese waren sehr groß, hatten ein mit saurem Gliafaserprotein gefülltes Zytoplasma und breite, lange Zellausläufer (*Abb. 78b*). 11 Hunde zeigten eine größere Anzahl von Astrozyten im Grenzbereich von weißer zu grauer Substanz (Assoziationsfaserbereich) als in der Mitte der weißen Substanz.

4.7.3.3 Statistische Auswertung

In einem Gruppenvergleich (Varianzanalyse) konnten zwischen den jungen (Gruppe 1, 2-3 Jahre) und den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) bezüglich der Anzahl Astrozyten in grauer und weißer Substanz kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. Darüber hinaus bestand kein Zusammenhang zwischen der Plaquedichte und der Astrozytenanzahl in weißer und grauer Substanz.

4.7.4 Doppelmarkierung

Bei der Doppelmarkierung ausgewählter Schnitte mittels Silberfärbung und Immunhistologie für eine gleichzeitige Darstellung von Plaques und Astrozyten konnten schwarz gefärbte Plaques und braun gefärbte Astrozyten dargestellt werden (*Abb. 79a*). In der grauen Substanz der Großhirnrinde lagen die Plaques und Astrozyten nebeneinander vor; es trat keine eindeutige räumliche Kolo-kalisation von Plaques und Zellen auf (*Abb. 79b und 79c*). Im Bereich der

oberflächlich gelegenen Großhirnwindungen, die zahlreiche Astrozyten aufwiesen, lagen nur vereinzelte Plaques vor. In den in die Tiefe ziehenden Großhirnfurchen (Gyrus cinguli), die nur wenige Astrozyten aufwiesen, fanden sich hingegen zahlreiche Plaques.

4.8 Nachweis pro-inflammatorischer Zytokine

Im Rahmen des Nachweises pro-inflammatorischer Zytokine wurde die Expression von Interleukin-1-, -6-, -12- und TNF- α bei jungen Hunden (Gruppe 1, 2-3 Jahre, n = 5), alten Hunden ohne Plaques (Gruppe 2, 11-14 Jahre, n = 5) und alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre, n = 30) untersucht.

4.8.1.1 Junge Hunde

Im Gehirn der jungen Hunde (Gruppe 1, 2-3 Jahre, n = 5) konnte eine schwache **IL-1-Expression** in der Gefäßwand von meningealen Gefäßen bei 80% und in Kapillaren bei 60% der Hunde nachgewiesen werden. Bei 40% der Hunde lag in der weißen Substanz ein schwaches positives Signal in den Kapillaren vor. **IL-6, -12 und TNF- α** traten in den Gehirnen der jungen Hunde nicht auf.

4.8.1.2 Alte Hunde

Der immunhistologische Nachweis von **IL-1** zeigte bei den alten Hunden ohne und mit Plaques (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre, n = 35) ein schwaches, positives Signal zirkulär in der Tunica media der meningealen Arterien bei 100% der Hunde (*Abb. 80a und 80b*) und in den Kapillaren der grauen Substanz (*Abb. 81*) bei 97% der Hunde sowie der weißen Substanz bei 74% der Hunde (*Abb. 82*). Die häufig perivaskulär angeordneten, Lipofuszin-speichernden Makrophagen wiesen ein sehr schwaches, wahrscheinlich unspezifisches positives Signal auf. **IL-6** trat bei keinem der alten Hunde (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) im Neuropil oder den Gefäßen auf. Es fand sich lediglich bei einem Hund (Nr. 117, *Tab. 4*), der eine Polioenzephalitis unklarer Ursache aufwies, ein positives, zytoplasmatisches Signal in Lymphozyten der perivaskulären Entzündungszellinfiltrate. **IL-12** konnte bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) nicht nachgewiesen werden. **TNF- α** konnte bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) in der grauen Substanz des Großhirns bei 63% der Hunde in Form zahlreicher kleiner brauner Punkte, die sich lichtmikroskopisch keiner bekannten anatomischen Struktur zuordnen ließen, nachgewiesen werden (*Abb. 83*). Die Gefäße in grauer und weißer Substanz waren negativ. In der weißen Substanz fand sich bei

89% der Hunde im Grenzbereich zur grauen Substanz (Assoziationsfasern) ein bandförmiges, fein-gepunktetes Signal (*Abb. 84*). Im Hippocampus, der von 14 Hunden vorlag, fand sich bei 100% der Hunde ein aus zahlreichen, unterschiedlich großen Punkten bestehendes Signal (*Abb. 85*).

4.8.1.3 Statistische Auswertung

In einem Gruppenvergleich (Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich nach Nemenyi) konnten für die **IL-1-Expression** keine signifikanten Unterschiede zwischen den jungen (Gruppe 1, 2-3 Jahre) und den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) gefunden werden. Interessanterweise fand sich aber (Korrelationsanalyse) ein positiver Zusammenhang zwischen der Plaquedichte und der IL-1-Expression der Kapillaren der grauen Substanz ($r_s = 0,3383$, $p = 0,0469$). Die **TNF- α -Expression** wies im Gruppenvergleich (Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich nach Nemenyi) in der grauen Substanz ($p = 0,0395$), in der weißen Substanz ($p = 0,006$) und im Hippocampus ($p = 0,0106$) signifikante Unterschiede zwischen den jungen (Gruppe 1, 2-3 Jahre) und den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) auf. Zwischen Gruppe 2 und 3 fanden sich keine Unterschiede und ein Zusammenhang (Korrelationsanalyse) zwischen der Plaquedichte und der TNF- α -Expression in allen drei Regionen konnte nicht aufgezeigt werden.

4.9 Nachweis TUNEL-positiver Zellen

4.9.1.1 Junge Hunde

In den Gehirnen der **jungen Hunde** (Gruppe 1, 2-3 Jahre, $n = 5$) fanden sich bei 40% der Hunde in der grauen Substanz sehr vereinzelte, TUNEL-positive Neuronenkerne. Das positive Signal bestand aus einer intensiven, auf den Kern begrenzten Rotfärbung. Es ist wichtig zu erwähnen, daß sich korrespondierend zu diesem Signal keine morphologischen Anzeichen für Apoptose, wie z.B. Kernschrumpfung, apoptotische Körperchen und ein stark eosinophil gefärbtes Zytoplasma fanden. In der weißen Substanz lag bei einem Hund (Nr. 17, *Tab. 4*) ein schwaches, positives Signal vor, das sich nicht eindeutig einer bestimmten anatomischen Struktur zuordnen ließ.

4.9.1.2 Alte Hunde

In der Gruppe der **alte Hunde ohne Plaques** (Gruppe 2, 11-14 Jahre, $n = 5$) traten bei einem Hund (Nr. 106, *Tab. 4*, *Anhang 9.4*) vereinzelte, TUNEL-positive Neuronenkerne auf, ohne

daß sich ein Signal in der weißen Substanz fand. Ein Hund (Nr. 56, *Tab. 4*) zeigte ein schwach positives Signal in der weißen Substanz, ohne Beteiligung der grauen Substanz. Alle übrigen Hunde wiesen keine TUNEL-positiven Zellen auf.

In den Gehirnen der **alten Hunde mit Plaques** (Gruppe 3, 10-18 Jahre, $n = 30$) zeigten 17% der Hunde (Nr. 78, 87, 88, 98, 117, *Tab. 4*) zahlreiche TUNEL-positive Neuronenkerne in der grauen Substanz insbesondere in den Großhirnfurchen auf (*Abb. 86*). In der weißen Substanz fanden sich bei drei dieser Hunde (Nr. 87, 78, 117, *Tab. 4*) ebenfalls zahlreiche TUNEL-positive Zellen, die morphologisch Mikrogliazellen ähnelten (*Abb. 87*). Die TUNEL-positiven Zellen in der weißen Substanz hatten intensiv rot gefärbte Kerne oder ein rot gefärbtes Zytoplasma; morphologisch waren aber auch hier keine eindeutigen Anzeichen für Apoptose erkennbar.

4.9.1.3 Statistische Auswertung

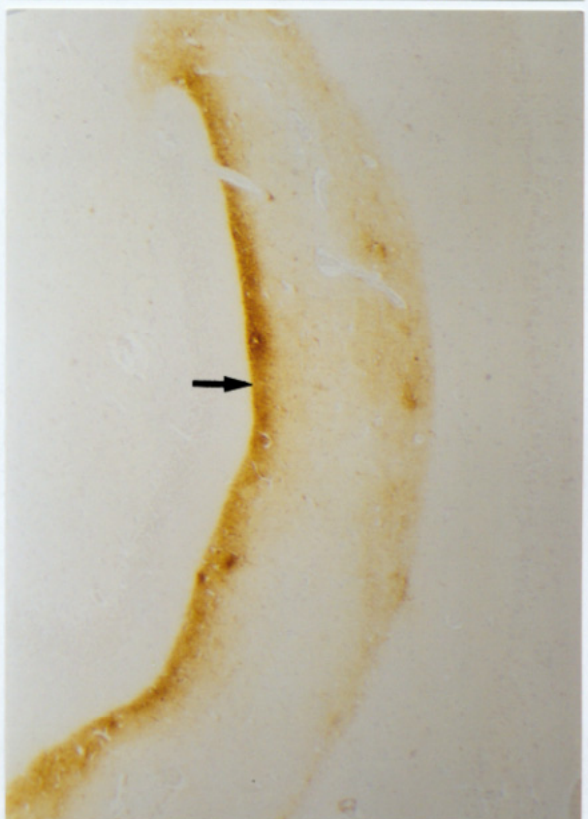
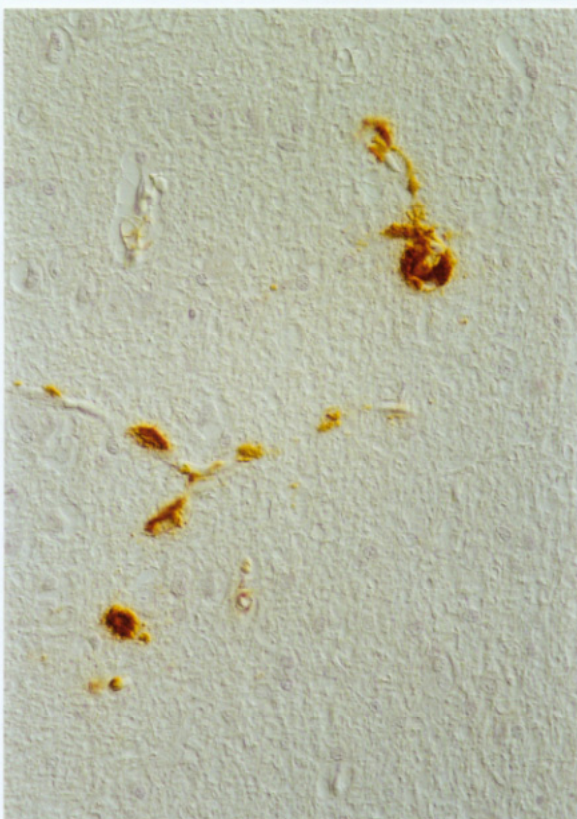
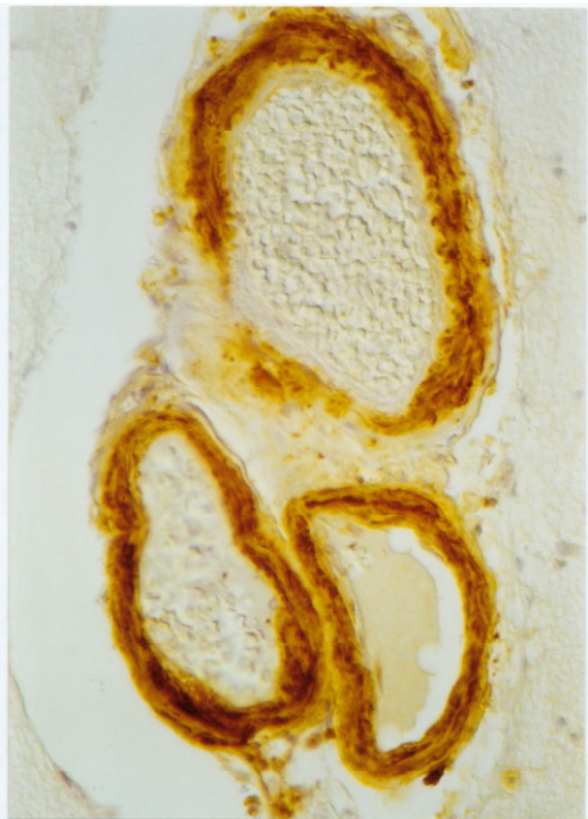
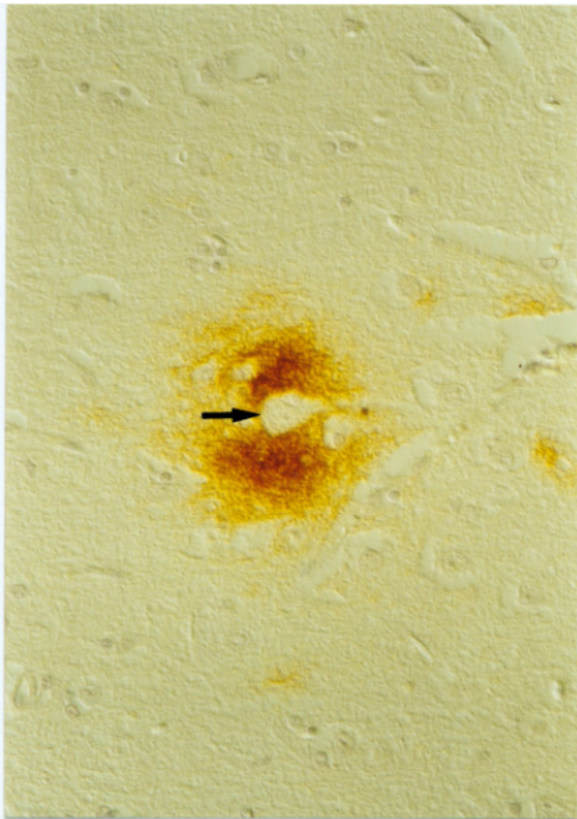
Es konnte in einem Gruppenvergleich (Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich nach Nemenyi) im Globaltest ein signifikanter Unterschied bezüglich der TUNEL-positiven Zellen in der grauen Substanz ($p = 0,0171$) und der weißen Substanz ($p = 0,0112$) zwischen den jungen (Gruppe 1, 2-3 Jahre) und den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) gefunden werden, der sich aber im anschließenden Nemenyi-Vergleich nicht bestätigen ließ. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl TUNEL-positiver Neuronen zwischen den alten Hunden ohne Plaques (Gruppe 2, 11-14 Jahre) und alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) konnte nicht aufgezeigt werden. Darüber hinaus (Korrelationsanalyse) fand sich kein Zusammenhang zwischen der Plaquedichte und der Anzahl TUNEL-positiver Neuronen in der grauen Substanz.

4.10 Histologische Abbildungen

In den gedruckten Exemplaren (DIN A5) sind alle Vergrößerungsangaben um ca. 42% zu verringern.

- Abbildung 19:** Typ-1-Plaque im Gehirn eines 13jährigen Hundes (Nr. 79) mit einem eingeschlossenen Neuron (Pfeil). (Anti-humanes- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 20:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 95) mit ausgeprägter β A4-Proteinablagerung in der Tunica media meningealer Gefäße. (Anti-humanes- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 21:** Gehirn eines 17jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 127) mit β A4-Proteinablagerungen in den Kapillaren der grauen Substanz. (Anti-humanes- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 22:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 95) mit einem bandartigen β A4-Protein-positivem Signal im Stratum moleculare des Hippocampus (Pfeil). (Anti-humanes- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 23x)

19	20
21	22

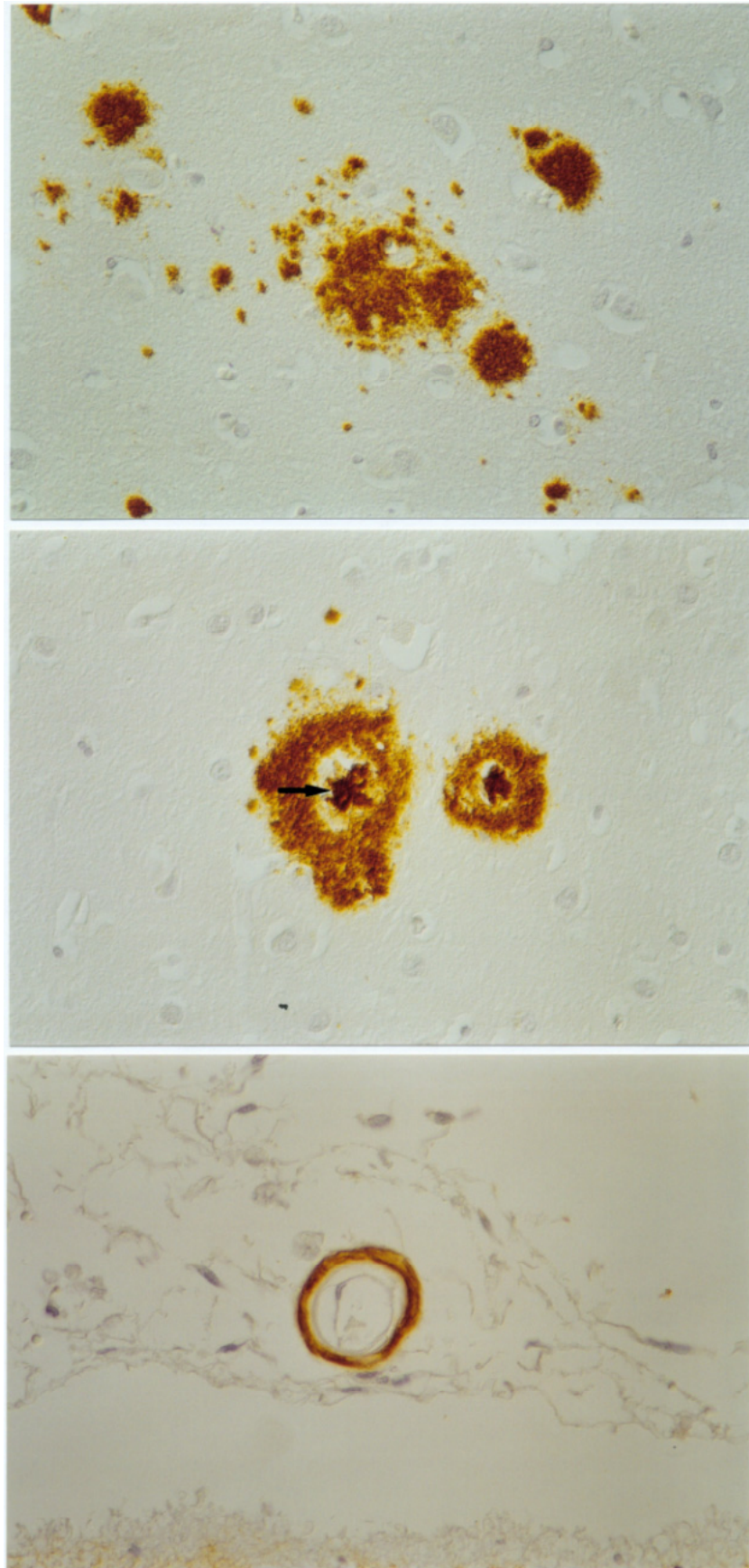


- Abbildung 23:** Mehrere diffuse Plaques im menschlichen Gehirn (S4/95). (Anti-humanen- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 24:** Zwei klassische/neuritische Plaques mit kondensiertem Amyloidkern (Pfeil) und einem Kranz dystrophischer Neuriten im menschlichen Gehirn (S4/95). (Anti-humanen- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 25:** Meningeales Gefäß mit β A4-Proteinablagerungen in der Tunica media im menschlichen Gehirn (S103/93). (Anti-humanen- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

23

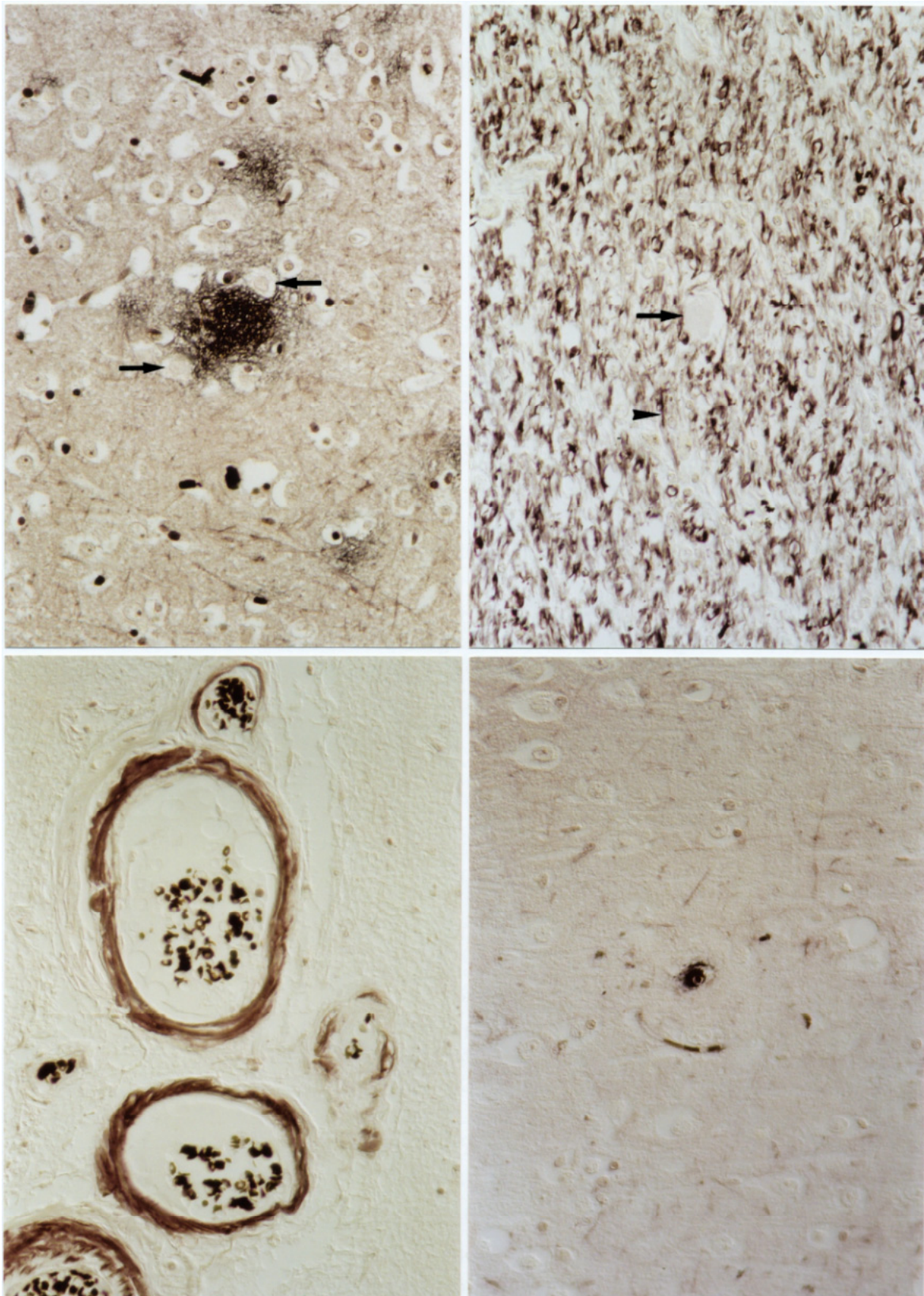
24

25



- Abbildung 26:** Typ 1-Plaque in der grauen Substanz eines 14jährigen Hundes (Nr. 88), der sich als Netzwerk zahlreicher fein-fädiger, schwarzer Strukturen darstellt. In der Umgebung sind mehrere intakte Neuronen erkennbar (Pfeile). (Silberfärbung, Campbell-Switzer-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 27:** Axone in der weißen Substanz eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) färben sich schwarz an (Pfeilspitze) und Sphäroide stellen sich nicht dar (Pfeil). (Silberfärbung, Campbell-Switzer-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 28:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 95) mit spezifischer Schwarzfärbung der Tunica media meningealer Gefäße an Stellen mit immunhistologisch nachweisbaren β A4-Proteinablagerungen. (Silberfärbung, Campbell-Switzer-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 29:** Gehirn eines 13jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 87) mit spezifischer Schwarzfärbung der Kapillaren in der grauen Substanz an Stellen mit immunhistologisch nachweisbaren β A4-Proteinablagerungen. (Silberfärbung, Campbell-Switzer-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

26	27
28	29

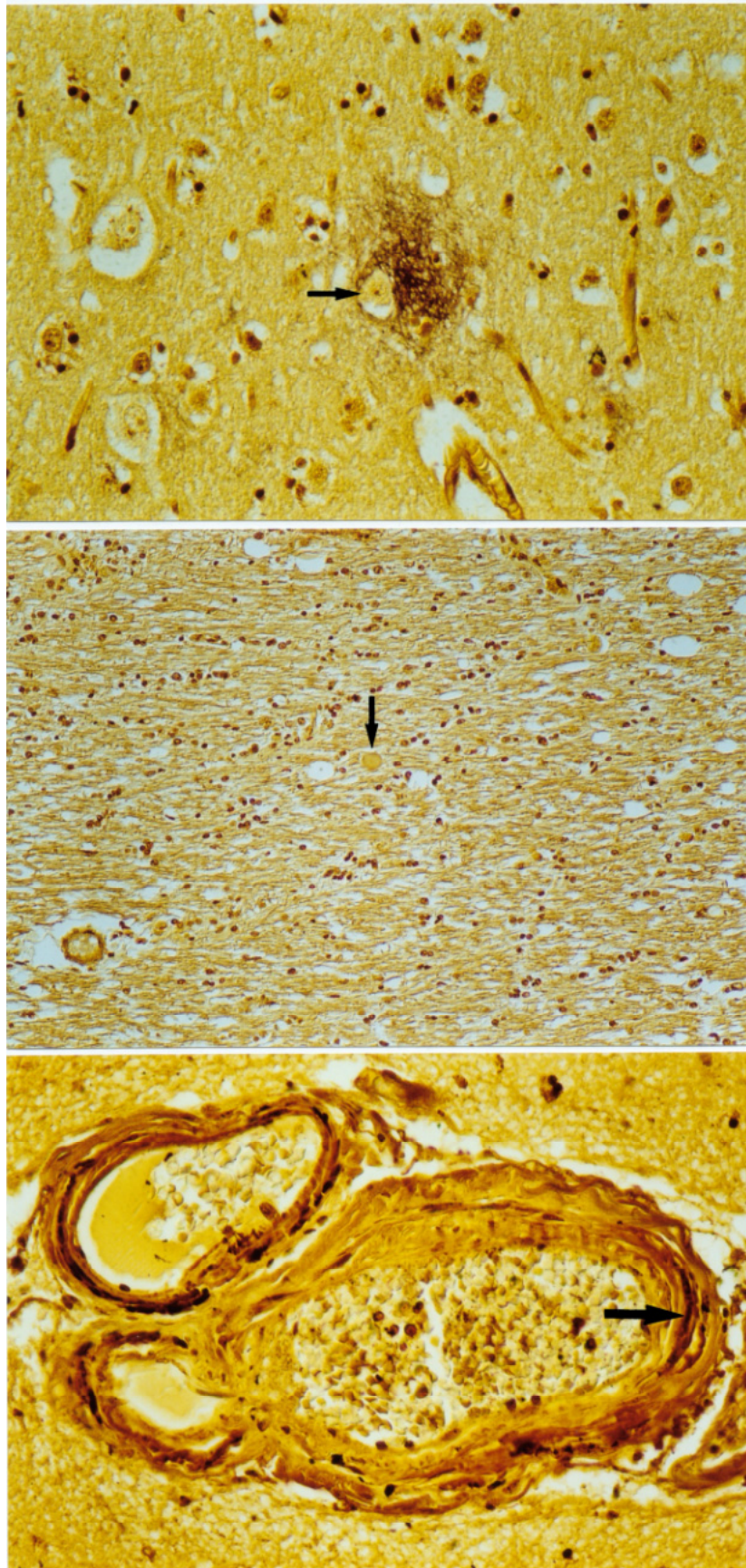


- Abbildung 30:** Typ 1-Plaque in der grauen Substanz eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 88), der sich als Netzwerk zahlreicher fein-fädiger, schwarzer Strukturen darstellt. Innerhalb des Plaques ist deutlich ein intaktes Neuron erkennbar (Pfeil). (Silberfärbung, Reusche-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 31:** Axone in der weißen Substanz eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) färben sich gelb an, und dunkelgelb gefärbte Sphäroide sind gut erkennbar (Pfeil). (Silberfärbung, Reusche-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 185x)
- Abbildung 32:** Schwache, spezifische Schwarzfärbung der Tunica media meningealer Gefäße an Stellen mit immunhistologisch nachweisbaren β A4-Proteinablagerungen (Pfeil) im Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 95). (Silberfärbung, Reusche-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

30

31

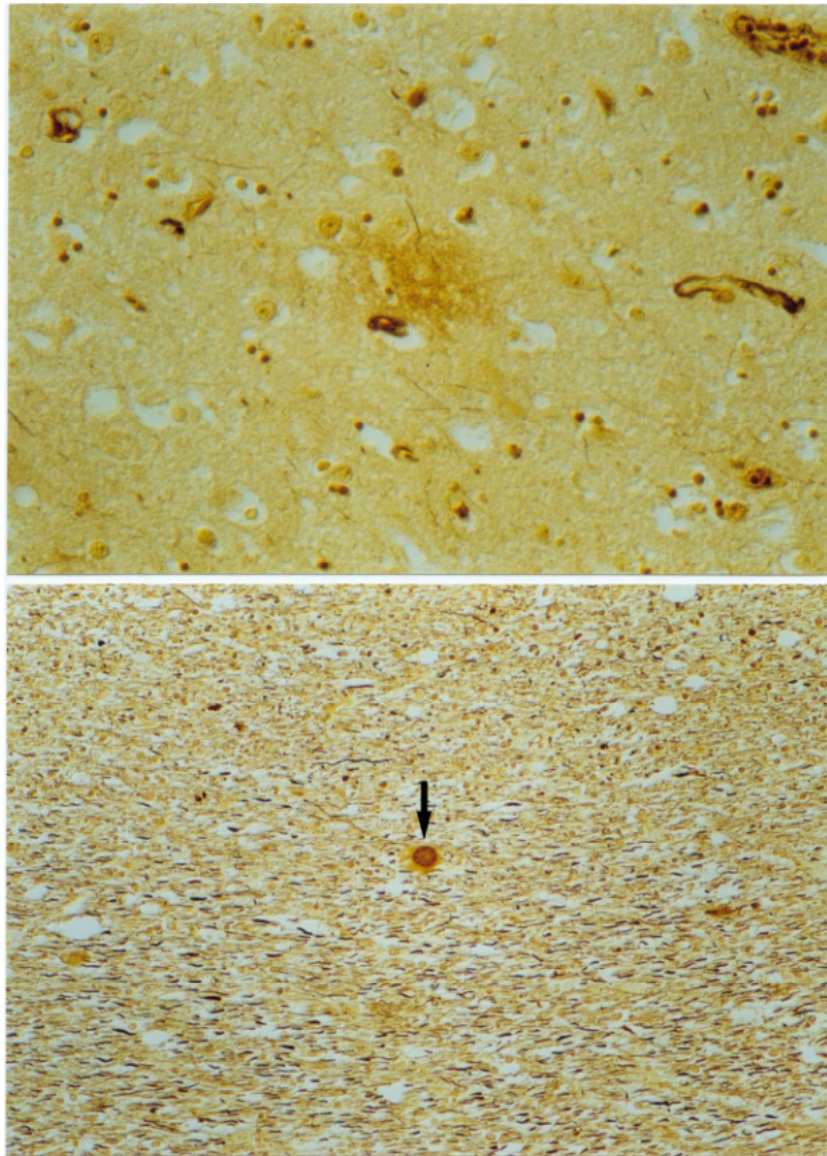
32



- Abbildung 33:** Typ 1-Plaque in der grauen Substanz eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 88), der sich als feinkörniges Gebilde mit vereinzelten fein-fädigen, braun-schwarzen Strukturen darstellt. (Silberfärbung, Bielschowsky-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 34:** Axone in der weißen Substanz eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) färben sich deutlich schwarz an und Sphäroide sind dunkelbraun gefärbt und sehr gut erkennbar (Pfeil). (Silberfärbung, Bielschowsky-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 185x)

33

34



- Abbildung 35:** Axone in der weißen Substanz eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) färben sich violett an und Sphäroide stellen sich als dunkelviolette rund-ovale Gebilde dar (Pfeil). (Silberfärbung, Bodian-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 185x)
- Abbildung 36:** Spezifische, hellrote Färbung der Tunica media meningealer Gefäße an Stellen mit immunhistologisch nachweisbaren β A4-Proteinablagerungen im Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 95). (Silberfärbung, Bodian-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 37:** Spezifische, hellrote Färbung der Kapillaren (Pfeil) in der grauen Substanz des Gehirns an Stellen mit immunhistologisch nachweisbaren β A4-Proteinablagerungen im Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 88). (Silberfärbung, Bodian-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

35
36
37

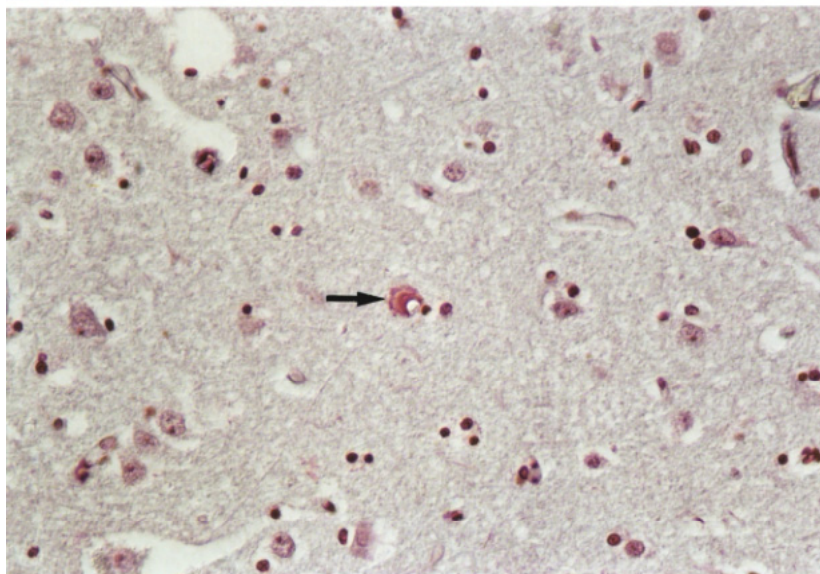
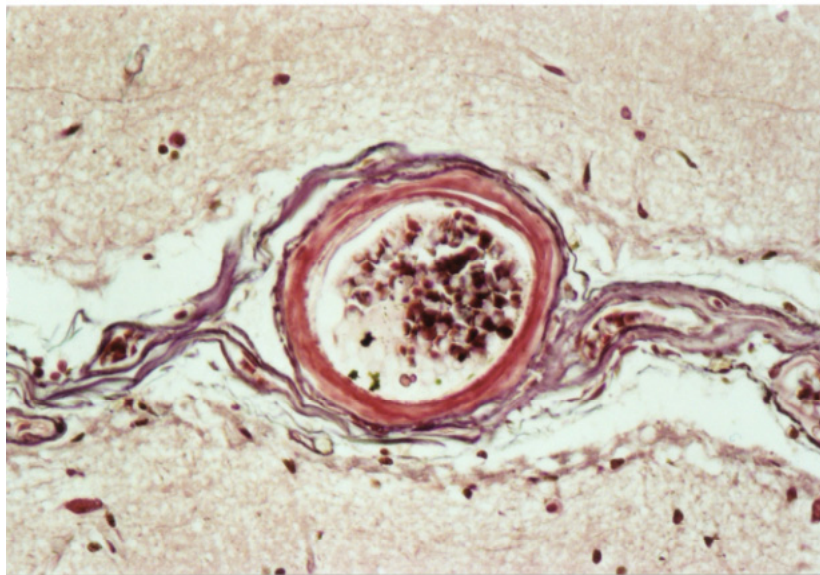
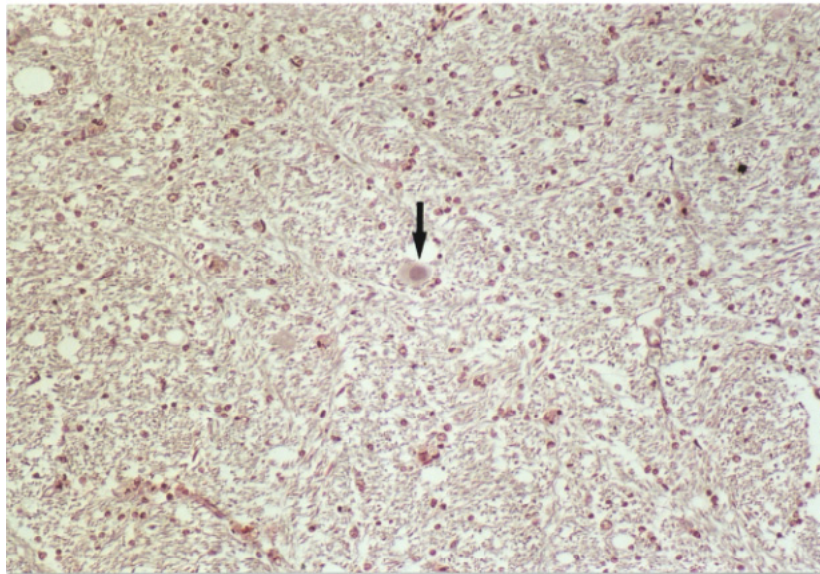
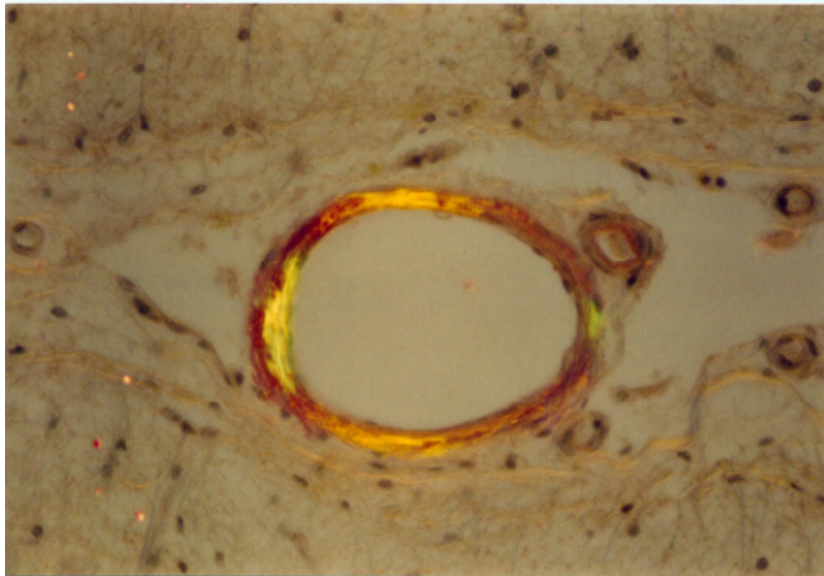
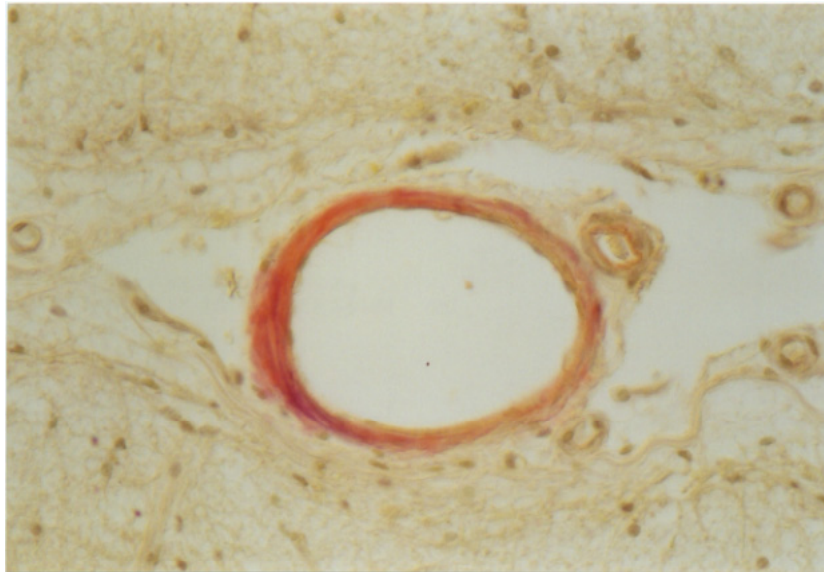


Abbildung 38a und b: Gehirn eines 13jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 87) mit kongophilen meningealen Gefäßen. (Folgeschnitte: a) Kongorot-Färbung ohne Polarisationsfilter, b) Kongorot-Färbung mit Polarisationsfilter, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

a) Spezifische, rote Färbung der Tunica media meningealer Gefäße an Stellen mit immunhistologisch nachweisbarer β A4-Proteinablagerung.

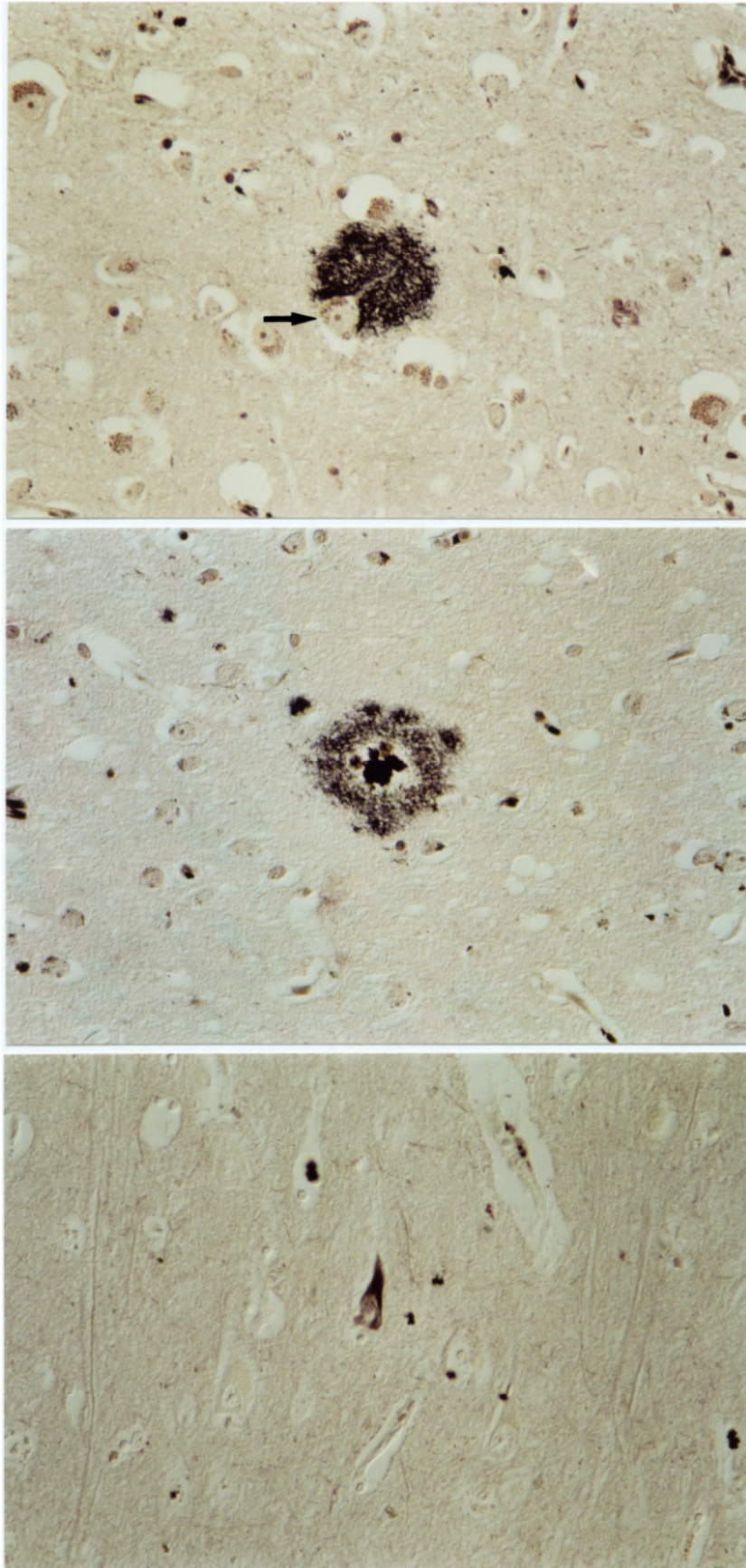
b) Typische Doppelbrechung des polarisierten Lichtes und grün-gelbliches Aufleuchten des in den meningealen Gefäßen in β -Faltblattstruktur vorliegenden β A4-Proteins.

38a
38b



- Abbildung 39:** Ein diffuser, schwarz angefärbter Plaque mit einem eingeschlossenen, deutlich erkennbaren Neuron (Pfeil) im menschlichen Gehirn (S4/95). (Silberfärbung, Campbell-Switzer-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 40:** Ein klassischer/neuritischer, schwarz angefärbter Plaque mit einem kondensierten Amyloidkern und einem Kranz dystrophischer Neuriten im menschlichen Gehirn (S4/95). (Silberfärbung, Campbell-Switzer-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 41:** Ein neurofibrilläres Bündel im Zytoplasma eines Neurons im menschlichen Gehirn (S103/93). (Silberfärbung, Campbell-Switzer-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

39
40
41

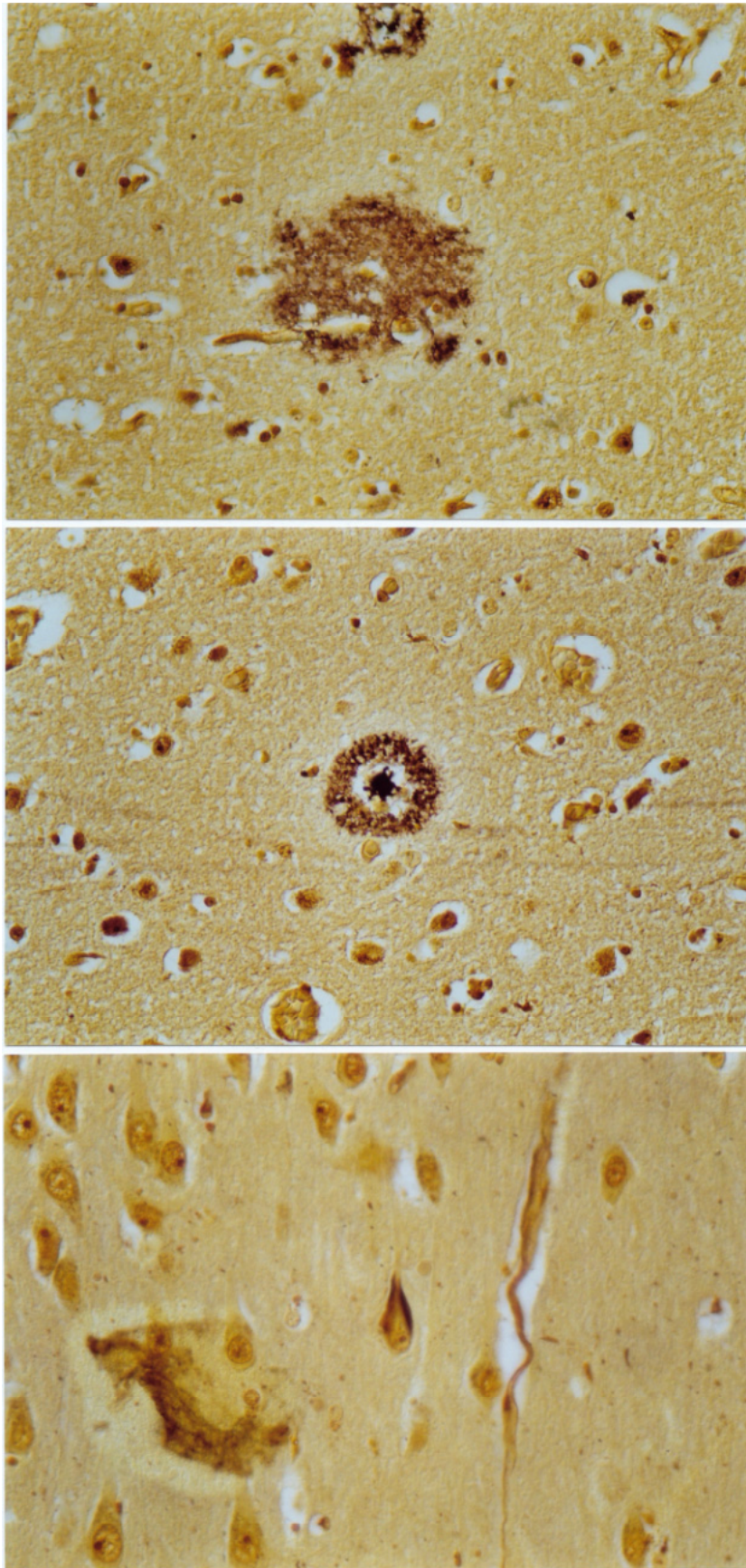


- Abbildung 42:** Ein diffuser, braun-schwarz gefärbter Plaque im menschlichen Gehirn (S4/95). (Silberfärbung, Reusche-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 43:** Ein klassischer/neuritischer, braun-schwarz angefärbter Plaque mit einem kondensierten Amyloidkern und einem Kranz dystrophischer Neuriten im menschlichen Gehirn (S4/95). (Silberfärbung, Reusche-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 44:** Ein neurofibrilläres Bündel im Zytoplasma eines Neurons im menschlichen Gehirn (S130/93). (Silberfärbung, Reusche-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

42

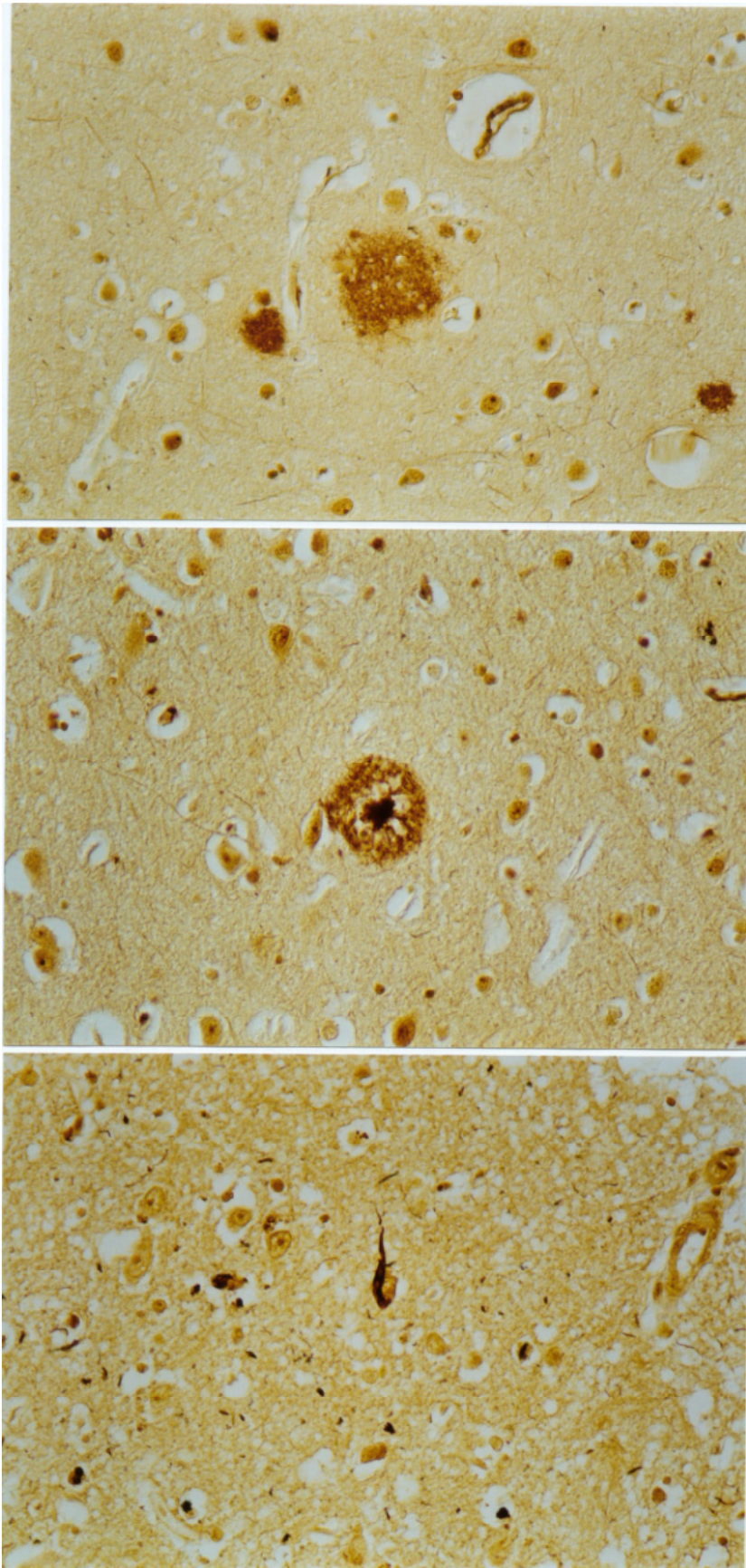
43

44



- Abbildung 45:** Ein diffuser, braun gefärbter Plaque im menschlichen Gehirn (S4/95). (Silberfärbung, Bielschowsky-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 46:** Ein klassischer/neuritischer, braun angefärbter Plaque mit einem kondensierten Amyloidkern und einem Kranz dystrophischer Neuriten im menschlichen Gehirn (S4/95). (Silberfärbung, Bielschowsky-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 47:** Ein neurofibrilläres Bündel im Zytoplasma eines Neurons im menschlichen Gehirn (S103/93). (Silberfärbung, Bielschowsky-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

45
46
47



- Abbildung 48:** Ein diffuser, violett angefarbter Plaque im menschlichen Gehirn (S4/95). (Silberfärbung, Bodian-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 49:** Ein klassischer/neuritischer, violett angefarbter Plaque mit einem kondensierten Amyloidkern und einem Kranz dystrophischer Neuriten im menschlichen Gehirn (S4/95). (Silberfärbung, Bodian-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 50:** Ein hellviolett angefarbtes neurofibrilläres Bündel im menschlichen Gehirn (S103/93). (Silberfärbung, Bielschowsky-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

48

49

50

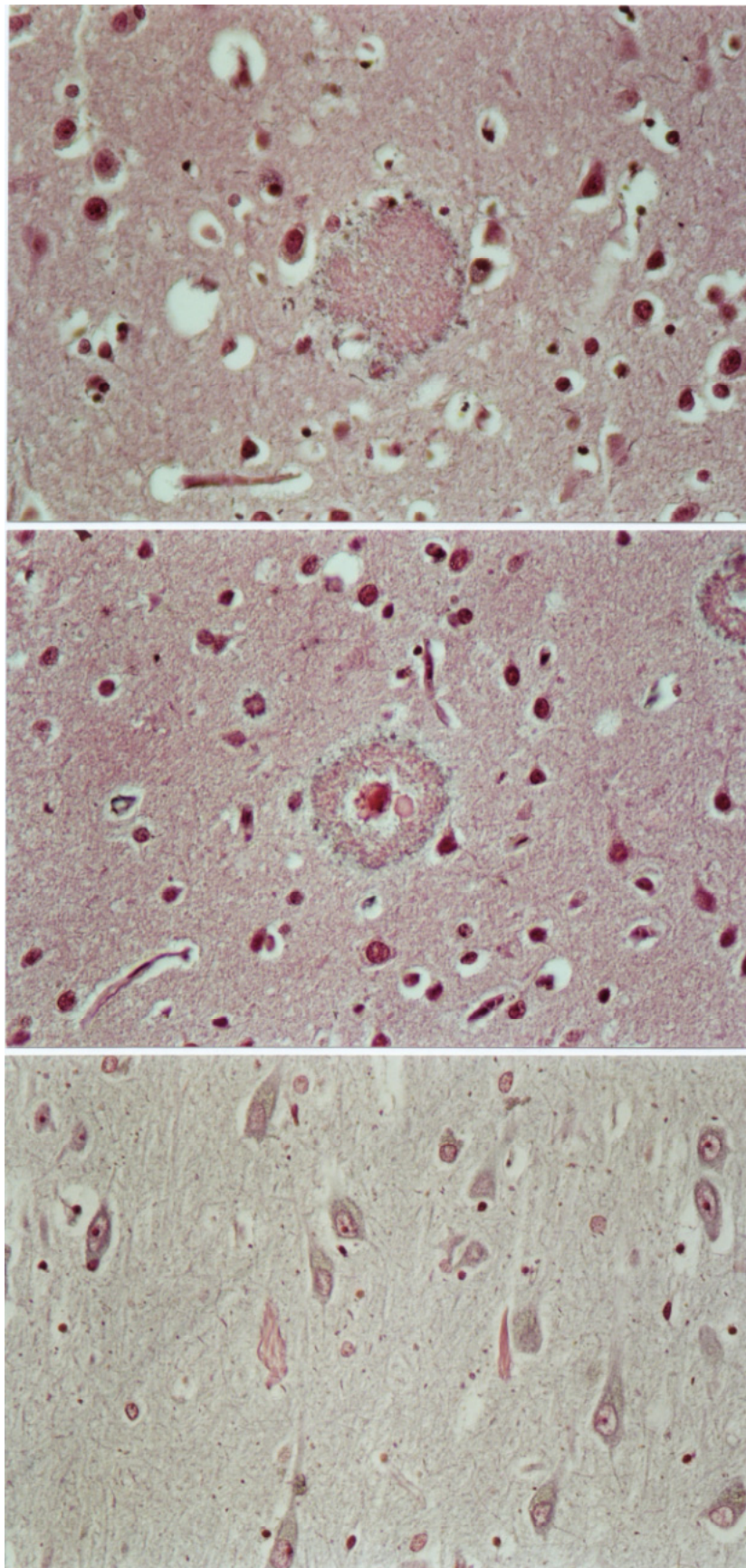


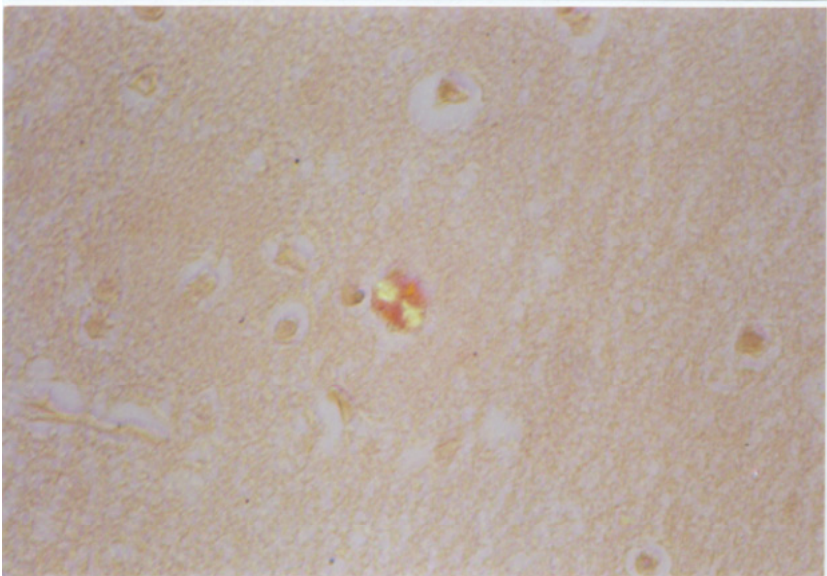
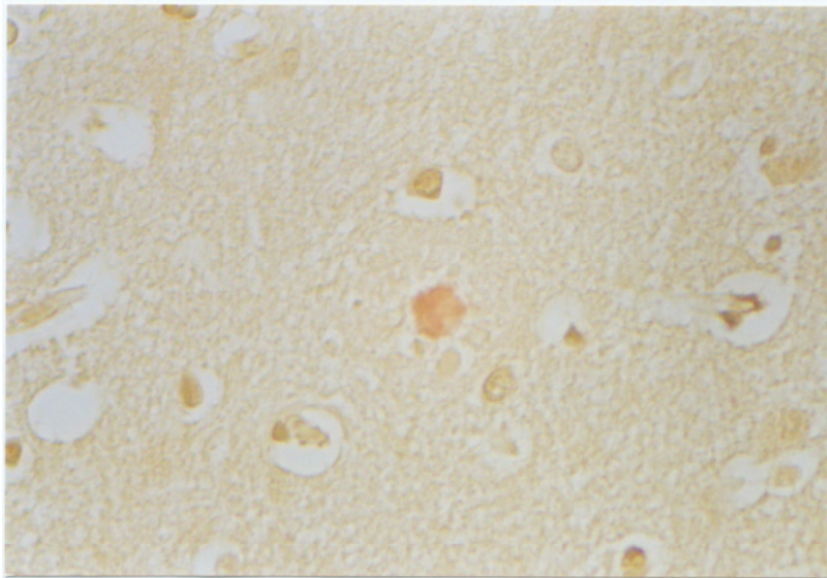
Abbildung 51: Intrazytoplasmatische neurofibrilläre Bündel im menschlichen Gehirn (S103/93). (Silberfärbung, Gallyas-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

Abbildung 52a und b: Ein klassischer/neuritischer Plaques mit einem zentralen Amyloidkern im menschlichen Gehirn (S4/95). (Folgeschnitte: a) Kongorot-Färbung ohne Polarisationsfilter, b) Kongorotfärbung mit Polarisationsfilter, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 925x)

a) Typische Rotfärbung des zentralen Amyloidkerns.

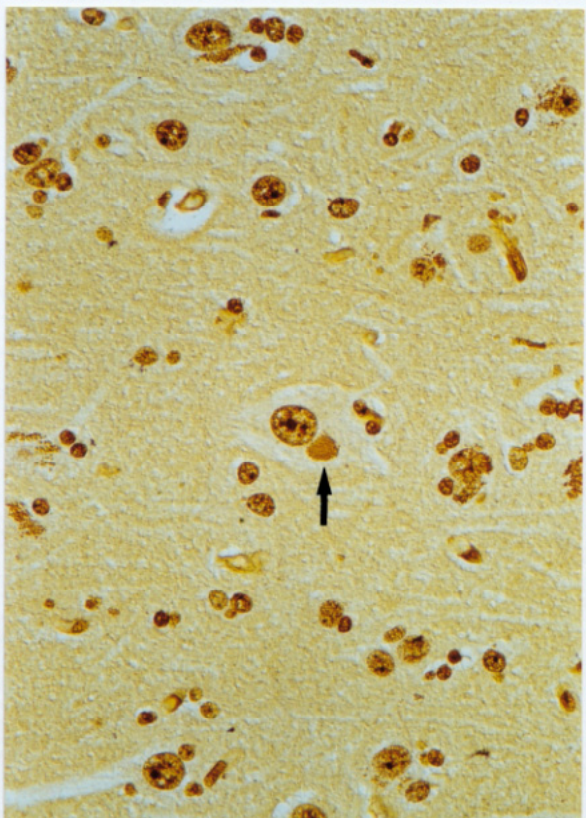
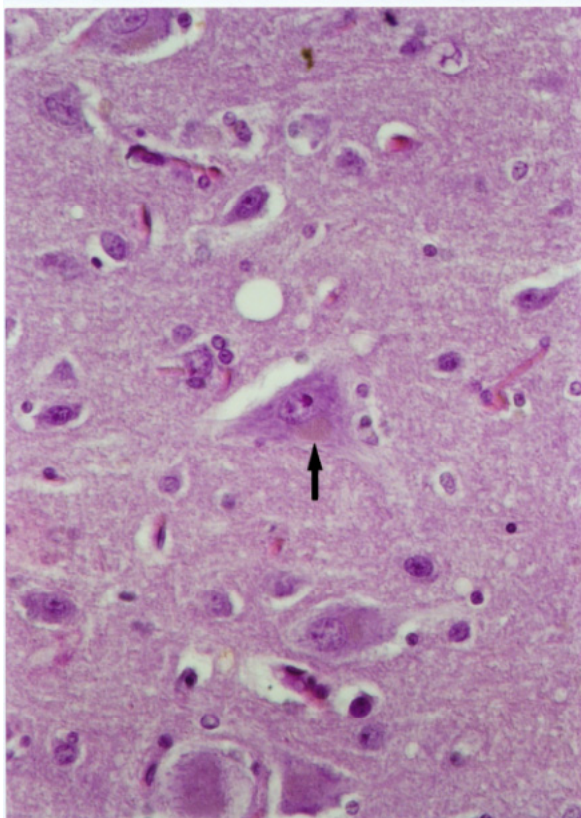
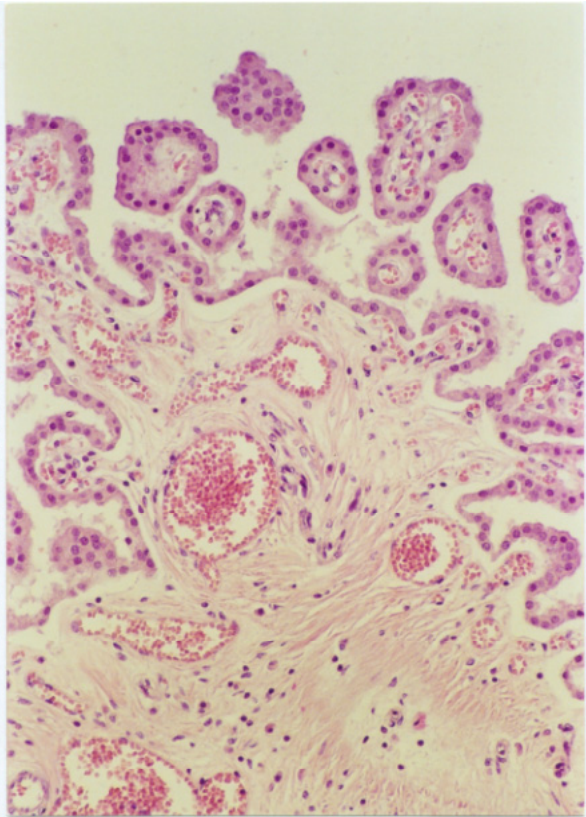
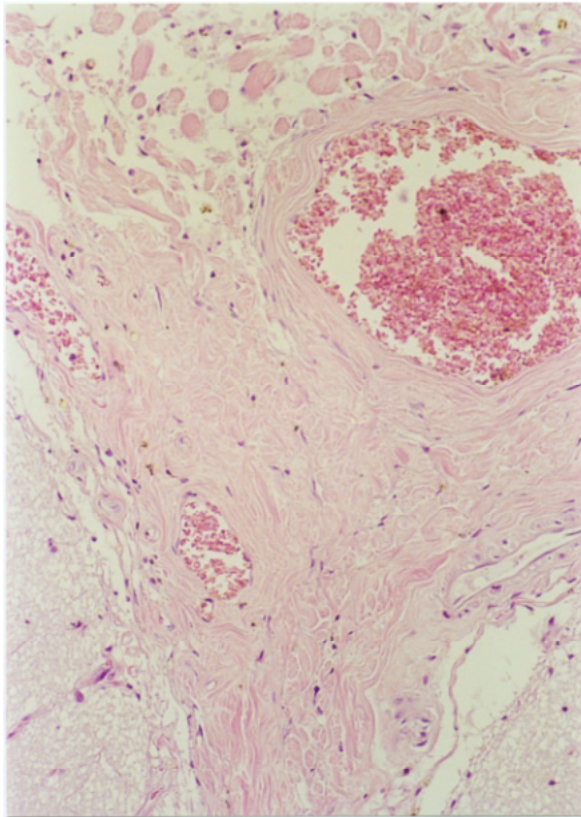
b) Grün-gelbliches Aufleuchten des Amyloidkerns durch Doppelbrechung des polarisierten Lichtes.

51
52a
52b



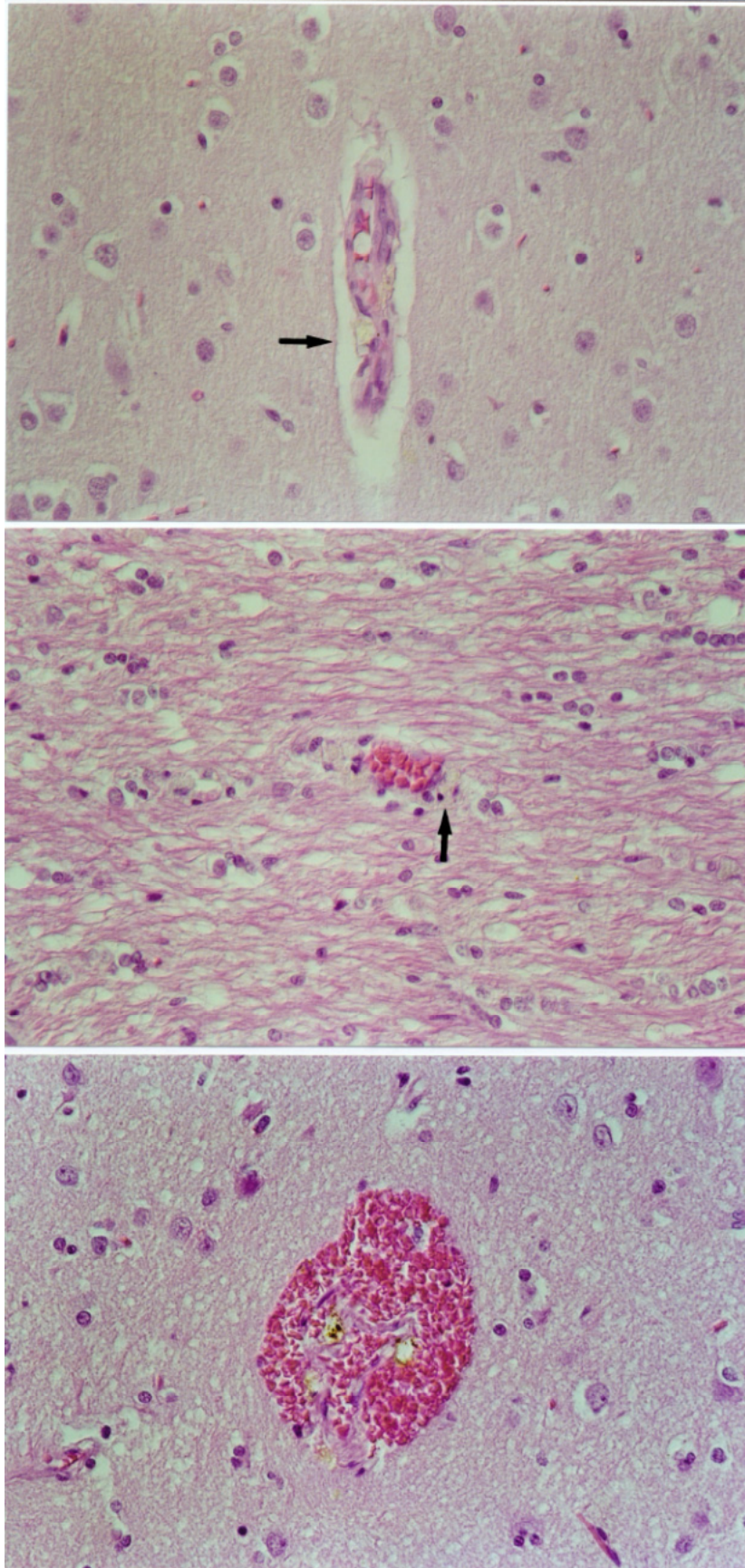
- Abbildung 53:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 100) mit einer Meninxfibrose. (HE-Färbung, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 185x)
- Abbildung 54:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) mit einer Fibrose des Plexus chorioideus. (HE-Färbung, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 185x)
- Abbildung 55a und b:** Gehirn eines 16jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 120) mit Lipofuszenspeicherung im Zytoplasma von Neuronen. (Folgeschnitte, a: HE-Färbung, b: Reusche-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- a)** Körnige, gelbliche Lipofuszinablagerungen im Zytoplasma eines Neurons (Pfeil).
- b)** Körnige, braun gefärbte intrazytoplasmatische Lipofuszinablagerungen in einem Neuron (Pfeil).

53	54
55a	55b



- Abbildung 56:** Gehirns eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) mit perivaskulär gelegenen, Lipofuszin-haltigen Makrophagen in der grauen Substanz (Pfeil). (HE-Färbung, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 57:** Gehirns eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) mit perivaskulär gelegenen, Lipofuszin-haltigen Makrophagen in der weißen Substanz (Pfeil). (HE-Färbung, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 58:** Gehirns eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) mit einer perikapillären Blutung in der grauen Substanz. (HE-Färbung, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

56
57
58



- Abbildung 59:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 120) mit einem Sphäroid in der weißen Substanz (Pfeil). (HE-Färbung, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 60:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) mit einem gelb angefärbter Sphäroid in der weißen Substanz (Pfeil). (Reusche-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 61:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) mit einem braun angefärbten Sphäroid und schwarz angefärbten Axonen in der weißen Substanz (Pfeil). (Bielschowsky-Methode, modifiziert, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 62:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) mit einem violett angefärbten Sphäroid in der weißen Substanz (Pfeil). (Bodian-Methode, modifiziert, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

59	60
61	62

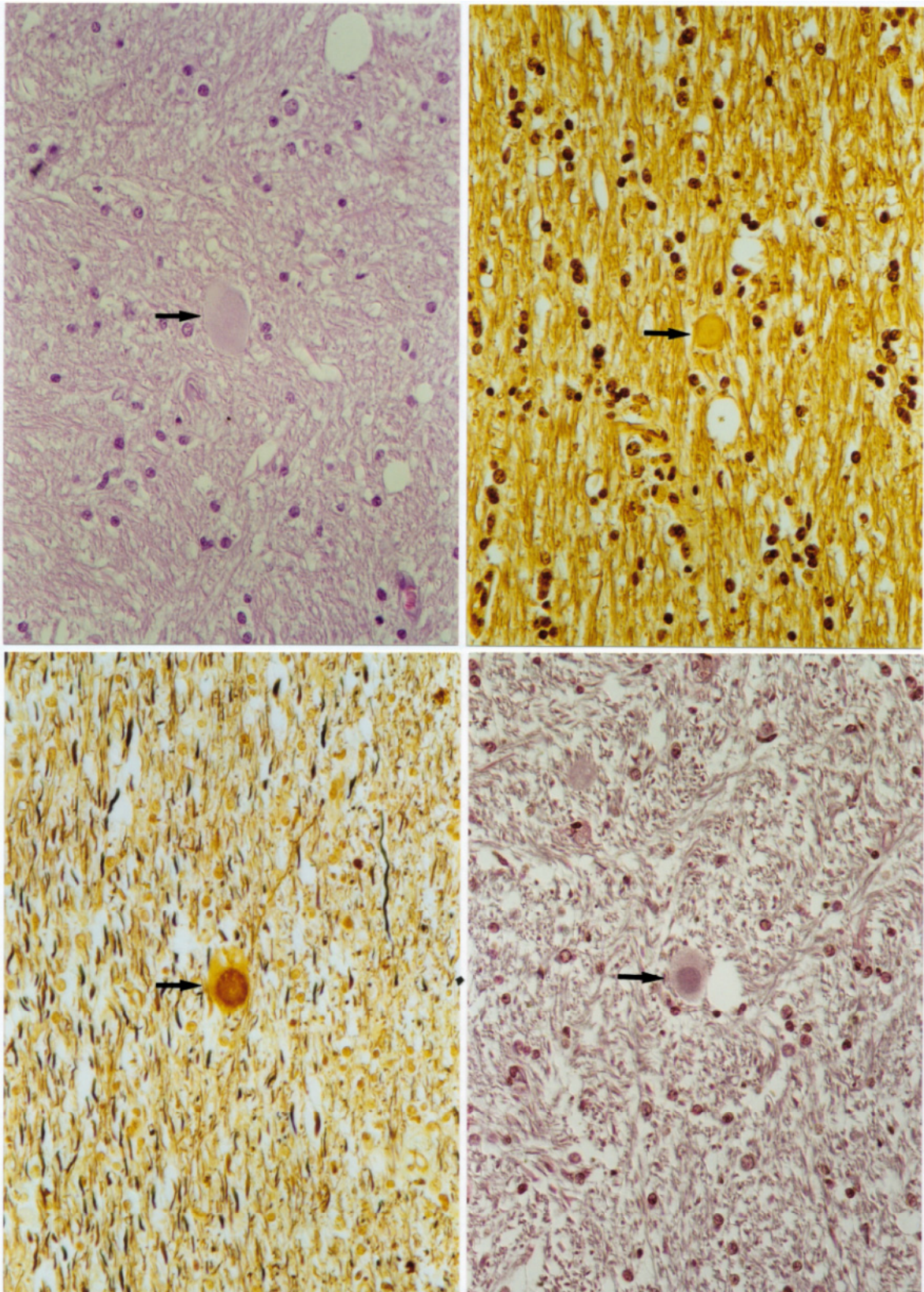
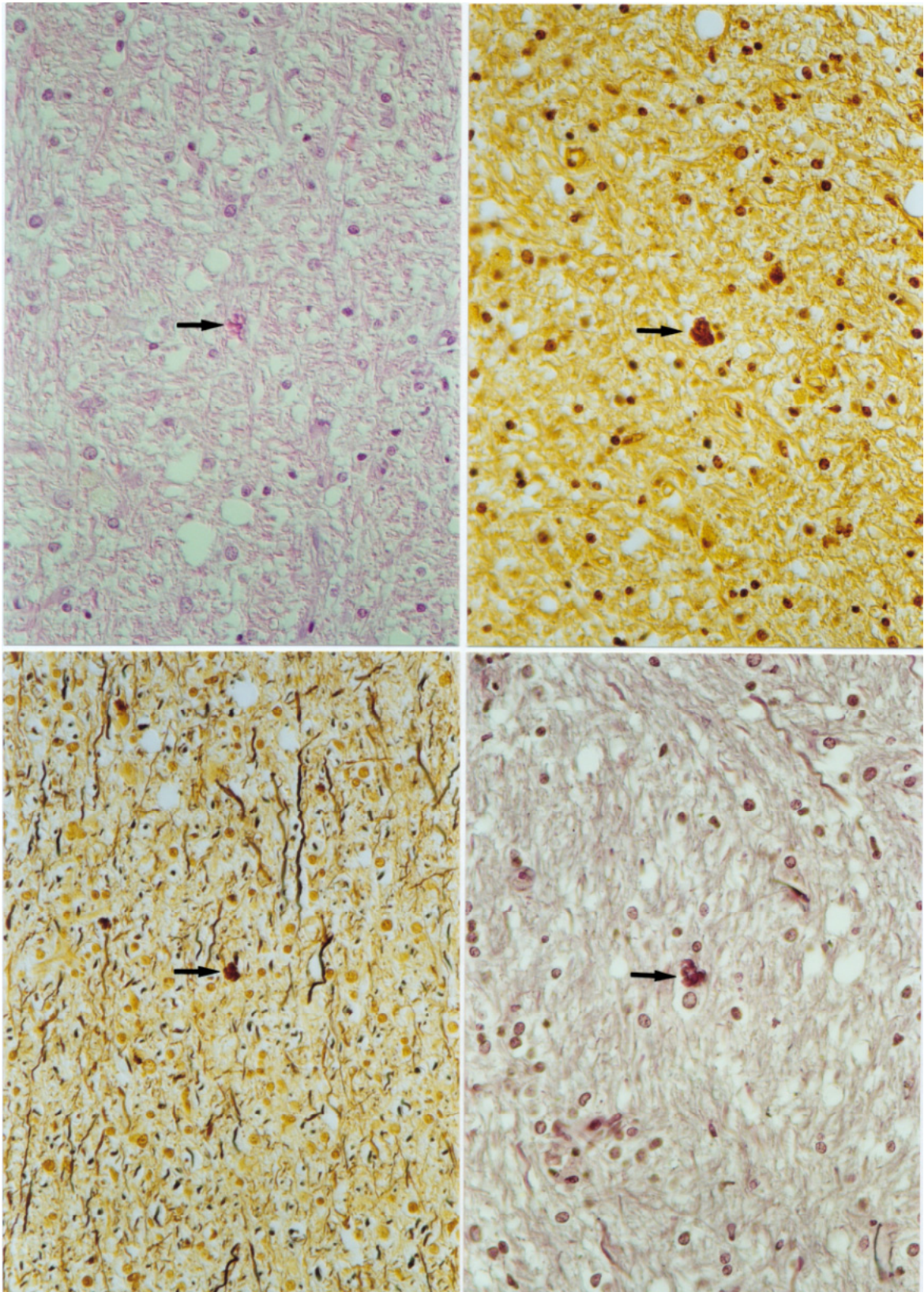


Abbildung 63a-d:

Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) mit sogenannten „eosinophilen Kügelchen“ in der weißen Substanz. (Folgeschnitte, a: HE-Färbung, b: Reusche-Methode, c: Bielschowsky-Methode, modifiziert, d: Bodian-Methode, modifiziert, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

- a)** Sogenannte „eosinophile Kügelchen“ zwischen bzw. in den Axonen der weißen Substanz (Pfeil).
- b)** Sogenannte „eosinophile Kügelchen“ in der Silberfärbung braun angefärbt (Pfeil).
- c)** Sogenannte „eosinophile Kügelchen“ in Verbindung mit Axonen in der weißen Substanz (Pfeil).
- d)** Sogenannte „eosinophile Kügelchen“ färben sich dunkelviolett an und heben sich gut gegen den Hintergrund ab (Pfeil).

63a	63b
63c	63d



- Abbildung 64:** Gehirn eines 17jährigen Hundes (Nr. 127) mit einem kondensierten Typ 1-Plaque in den oberflächlichen Kortexschichten 2 bis 4. (Anti-humanen- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 65:** Gehirn eines 14jährigen Hundes (Nr. 93) mit einem großflächigen Typ 2-Plaque in den tiefen Kortexschichten 5 und 6. (Anti-humanen- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 66:** Gehirn eines 14jährigen Hundes (Nr. 88) mit Plaques, die eine laminäre Verteilung vom Muster 1 aufweisen, d.h. kondensierte Typ 1-Plaques in den oberflächlichen Kortexschichten (Pfeilspitze) und großflächigen Typ 2-Plaques in den tiefen Kortexschichten (Pfeil). (M = Meninx, anti-humanen- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 23x)
- Abbildung 67:** Gehirn eines 14jährigen Hundes (Nr. 93) mit Plaques, die eine laminäre Verteilung vom Muster 2 aufweisen, d.h. großflächige Typ 2-Plaques in den tiefen Kortexschichten (Pfeil). (M = Meninx, anti-humanen- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 23x)

64	65
66	67

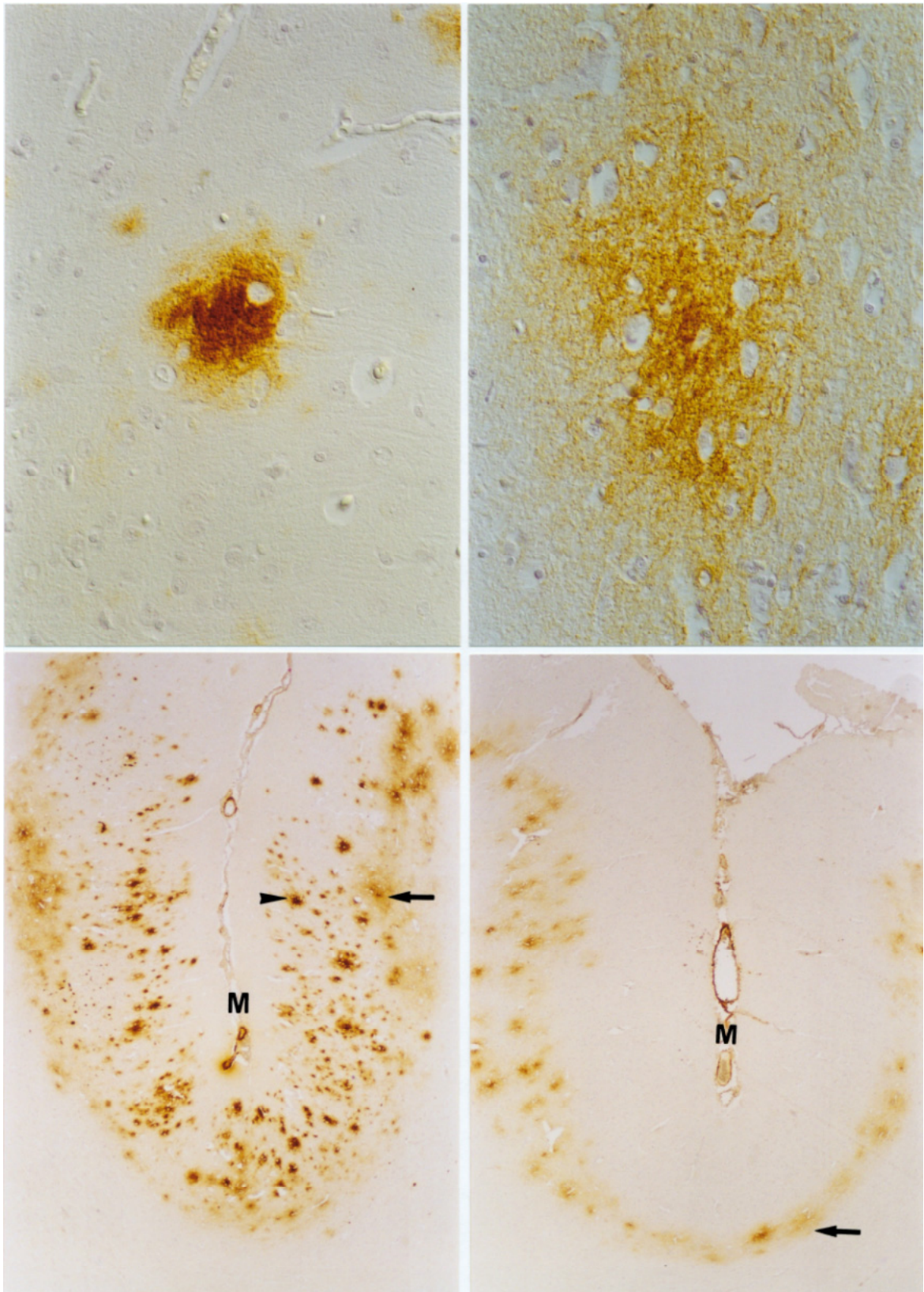
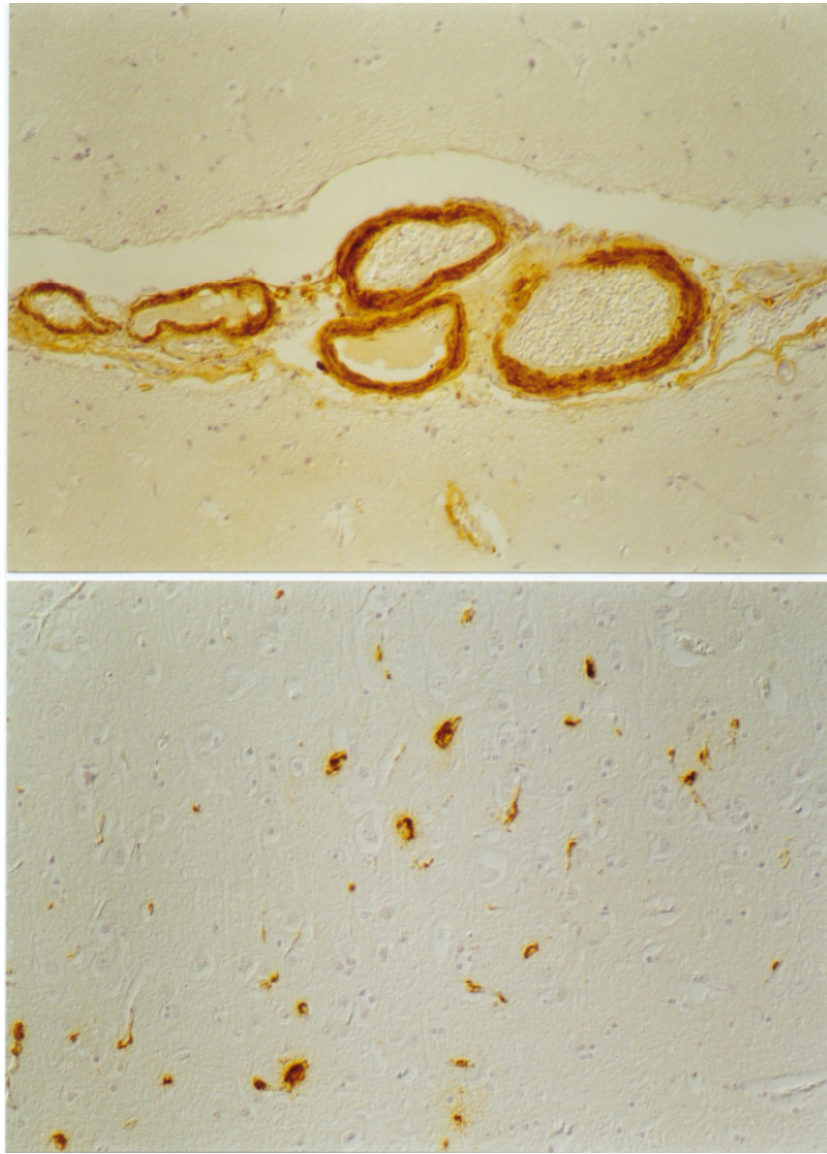


Abbildung 68: Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 95) mit zirkulären β A4-Proteinablagerungen in der Tunica media meningealer Gefäße. (Anti-humanen- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 185x)

Abbildung 69: Gehirn eines 16jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 122) mit β A4-Proteinablagerungen in den Kapillaren der grauen Substanz. (Anti-humanen- β -Amyloid, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 185x)

68

69



- Abbildung 70:** Neuronale APP-Expression in der Großhirnrinde eines 14jährigen Hundes ohne Plaques (Nr. 106). (Anti-humanes Amyloidvorläuferprotein, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 71:** Neuronale APP-Expression in der Großhirnrinde eines 10jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 49). (Anti-humanes Amyloidvorläuferprotein, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 72a und b:** Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 105) mit APP- und Neurofilament-positiven axonalen Sphäroiden in der weißen Substanz. (Folgeschnitte, a: Anti-humanes Amyloidvorläuferprotein, mAk, b: Anti-humanes Neurofilament, mAk, ABC-Methode, Paraffinschnitte, Vergrößerung 370x)
- a)** Deutliche, scharf begrenzte APP-Markierung eines Sphäroids. Die unveränderten Axone in der weißen Substanz färben sich nicht an.
- b)** Neurofilament-Markierung eines axonalen Sphäroids und der unveränderten Axone in der weißen Substanz.

70	71
72a	72b

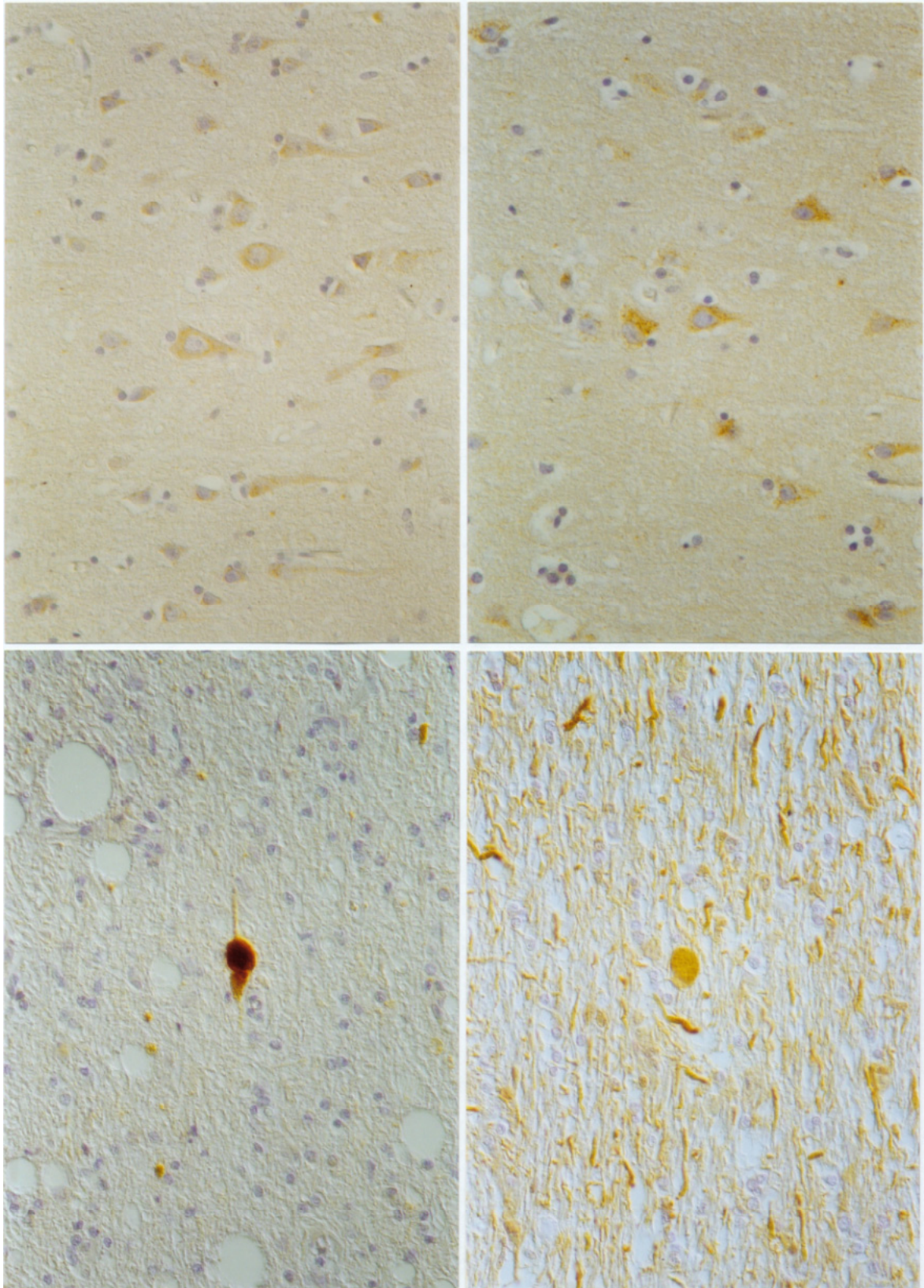


Abbildung 73a und b: MHC Klasse II-positive Mikrogliazellen in der weißen Substanz (a) und in der grauen Substanz (b) eines jungen Hundes (Nr. 132, 9 Monate). (Anti-kanines MHC Klasse II-Antigen, mAk, Gefrierschnitt, Vergrößerung: 370x)

a) Vereinzelte MHC Klasse II-positive Mikrogliazellen in der weißen Substanz mit einem kleinen Zellkörper und wenigen, dünnen Zellausläufern.

b) MHC Klasse II-positive Mikrogliazellen in der grauen Substanz mit einem kleinen, runden Zellkörper und kaum erkennbaren Zellausläufern.

Abbildung 74a und b: MHC Klasse II-positive Mikrogliazellen in der weißen Substanz (a) und in der grauen Substanz (b) eines 14-jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 98). (Anti-kanines MHC Klasse II-Antigen, mAk, Gefrierschnitt, Vergrößerung: 370x)

a) Zahlreiche MHC Klasse II-positive Mikrogliazellen in der weißen Substanz. Die Zellen haben einen großen Zellkörper mit viel Zytoplasma und lange, prominente Zellausläufer.

b) Mehrere MHC Klasse II-positive Mikrogliazellen in der grauen Substanz. Die Zellen haben einen runden Zellkörper und keine deutlichen Zellausläufer.

73a	73b
74a	74b

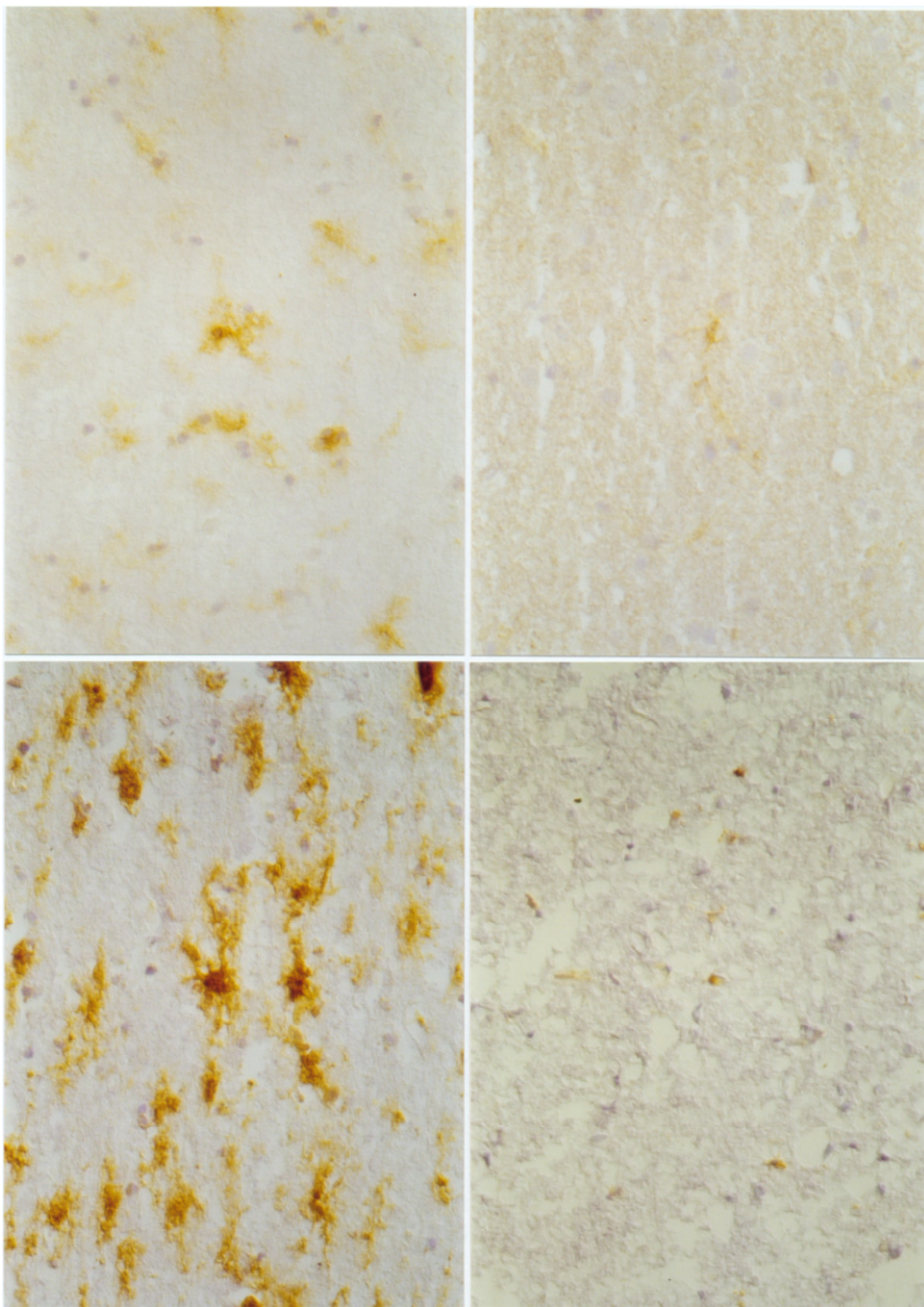


Abbildung 75a und b: BS-1-positive Zellen in der grauen (a) und weißen (b) Substanz eines jungen Hundes (Nr. 18, 2 Jahre). (Biotiniliertes Lektin aus *Bandeiraea simplicifolia*, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

- a)** Vereinzelte BS-1-positive Zellen, die sich überwiegend im perivaskulären Raum von Kapillaren in der grauen Substanz finden. Die Endothelzellen sind schwach positiv markiert.
- b)** Wenige BS-1-positive Zellen, die sich überwiegend perivaskulär um Kapillaren in der weißen Substanz anordnen. Die Endothelzellen sind ebenso positiv markiert.

Abbildung 76a und b: BS-1-positive Zellen in der grauen (a) und weißen (b) Substanz eines 18jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 129). (Biotiniliertes Lektin aus *Bandeiraea simplicifolia*, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

- a)** Zahlreiche BS-1-positive Zellen um die Kapillaren in der grauen Substanz. Die Zellen weisen ein großes, vakuoliges Zytoplasma auf.
- b)** Zahlreiche BS-1-positive Zellen um die Kapillaren und positive Endothelzellen in der weißen Substanz. Die Zellen weisen ebenso ein großes, mit zahlreichen Vakuolen durchsetztes Zytoplasma auf.

75a	75b
76a	76b

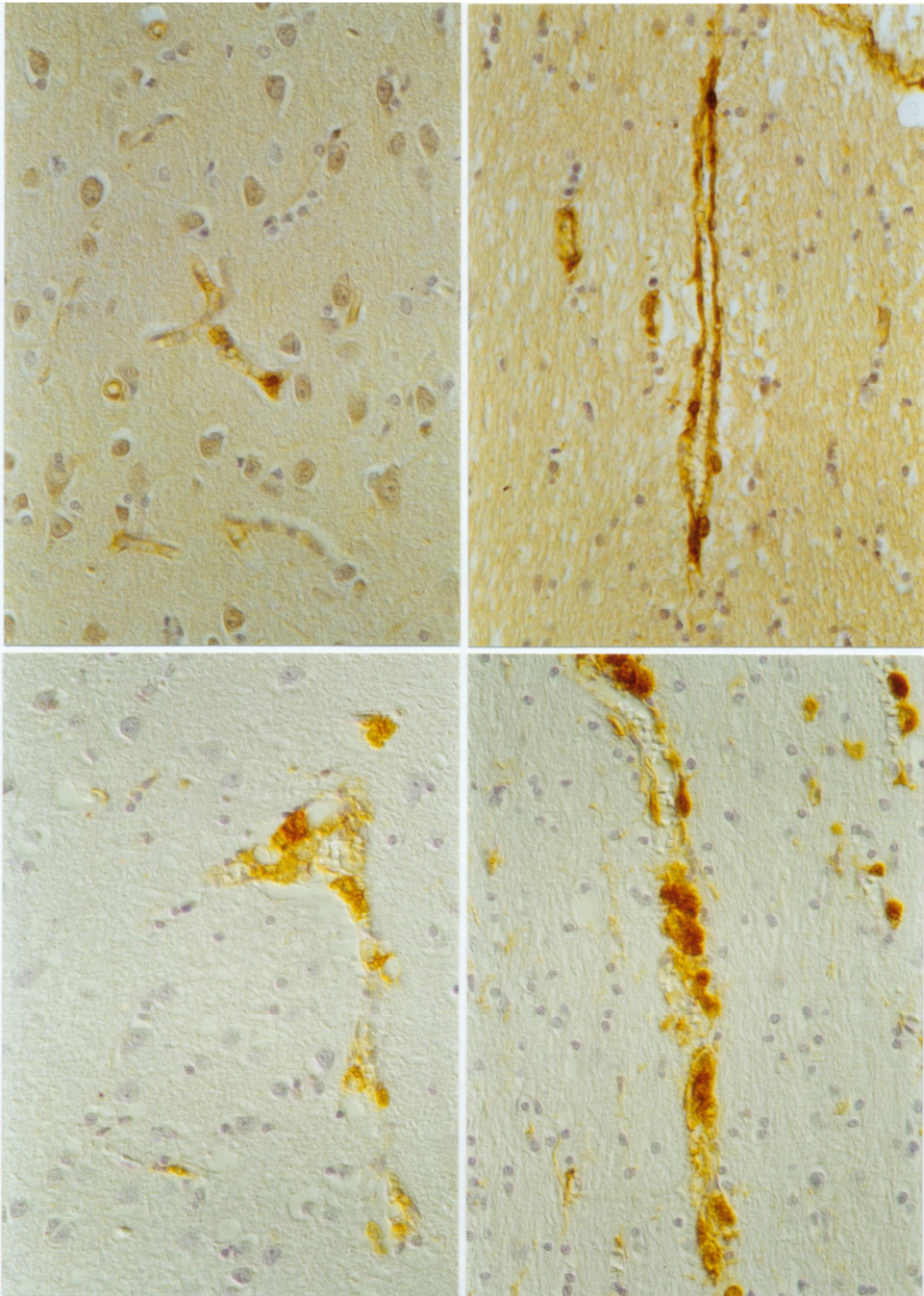


Abbildung 77a und b: GFAP-positive Astrozyten in der grauen (a) und weißen (b) Substanz eines jungen Hundes (Nr. 18, 2 Jahre). (Anti-bovines saures Gliafaserprotein, pAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

- a) Astrozyten in der grauen Substanz, die wenig GFAP im Zytoplasma aufweisen und kleine, kurze Zellausläufer haben.
- b) Zahlreichere Astrozyten in der weißen Substanz, die wenig intrazytoplasmatisches GFAP aufweisen und etwas längere Zellausläufer haben.

Abbildung 78a und b: GFAP-positive Astrozyten in der grauen (a) und weißen (b) Substanz eines 18jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 129). (Anti-bovines saures Gliafaserprotein, pAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

- a) Astrozyten in der grauen Substanz des Gehirns mit mäßig viel GFAP im Zytoplasma und zahlreichen Zellausläufern.
- b) Sehr große Astrozyten mit einem hohen intrazytoplasmatischen GFAP-Gehalt und sehr langen, prominenten Zellausläufern, die teilweise Kapillaren in der weißen Substanz umschließen.

77a	77b
78a	78b

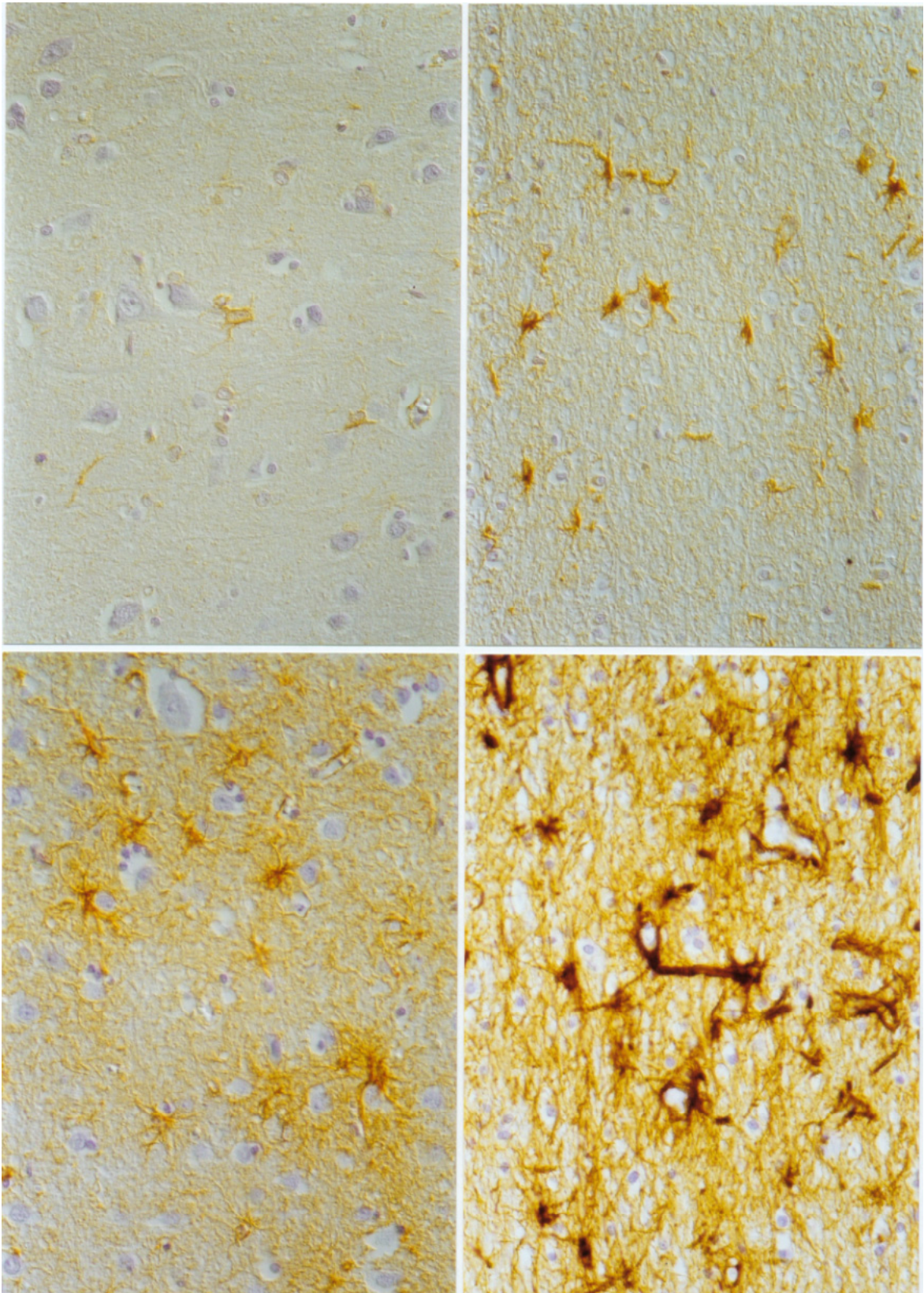


Abbildung 79a-c:

Doppelmarkierung zur gleichzeitigen Darstellung von Plaques und Astrozyten mittels Silberfärbung und Immunhistologie. (Campbell-Switzer-Methode (schwarz) und anti-bovines saures Gliafaserprotein, pAk (braun), Silberfärbung und ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: a: 23x, b und c: 370x)

a) Übersicht einer Großhirnfurche eines 14jährigen Hundes (Nr. 95). Im Stratum moleculare der Großhirnrinde liegen zahlreiche Astrozyten, die hier die Membrana limitans gliae superficialis bilden (Pfeil). In der grauen Substanz liegen zahlreiche Plaques und wenige Astrozyten, die hier um die Gefäße als Membrana limitans gliae perivascularis vorliegen. In der weißen Substanz sind zahlreiche fibröse Astrozyten erkennbar.

b und c) Gehirn eines 13jährigen Hundes (Nr. 79) mit Plaques (Pfeil) und Astrozyten (Pfeilspitzen), die nebeneinander in der grauen Substanz vorliegen und keine auffällige räumliche Kolokalisation aufweisen.

79a
79b
79c

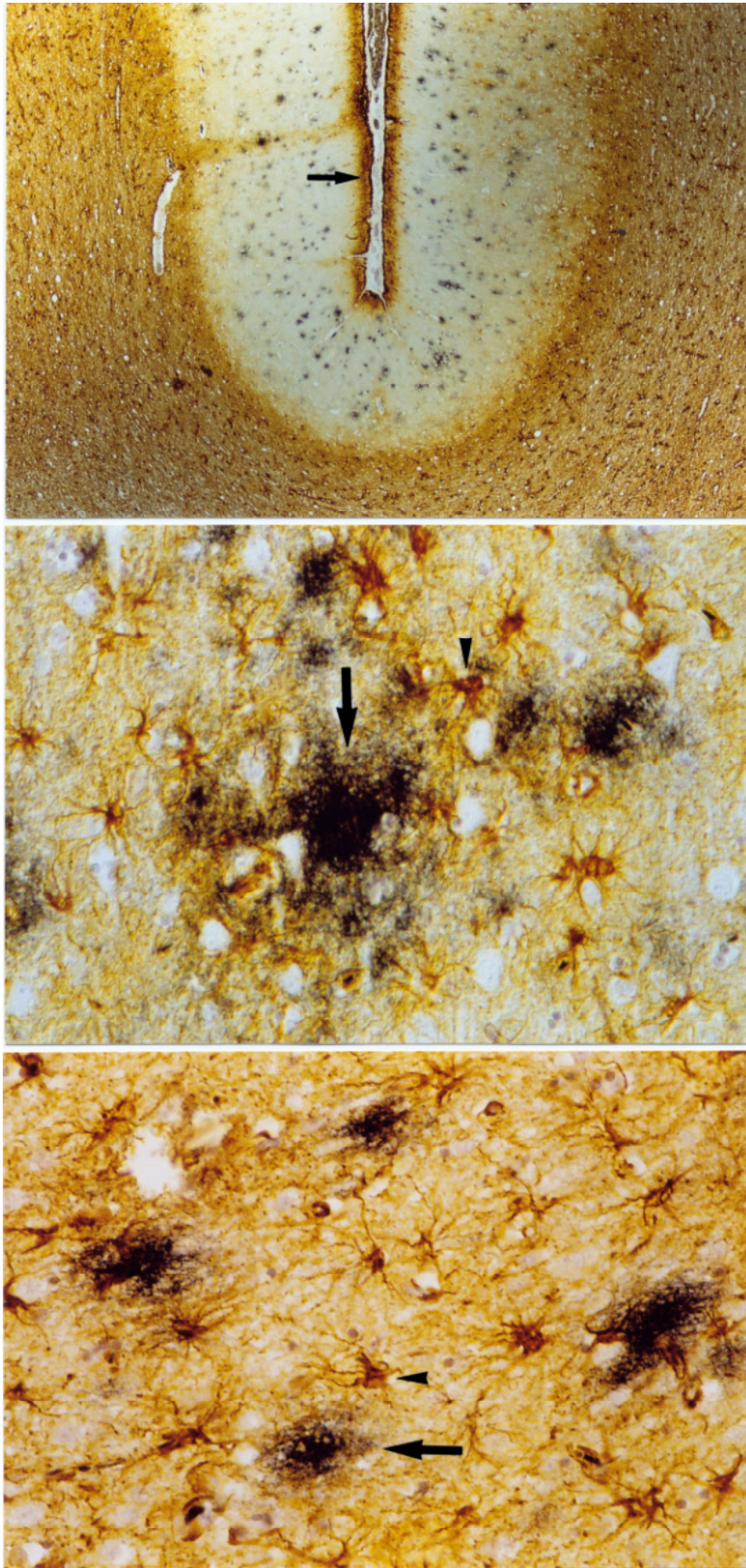


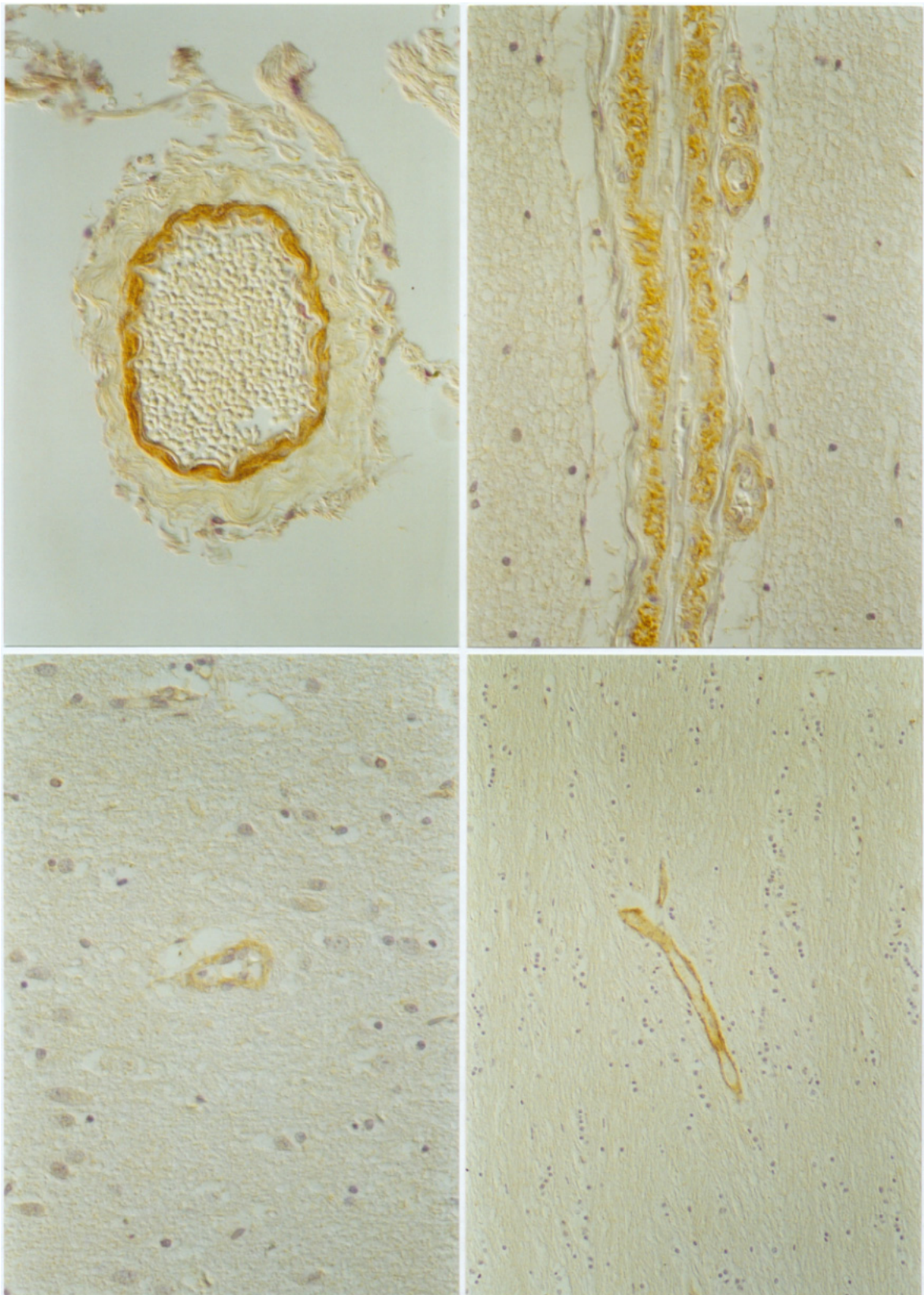
Abbildung 80a und b: IL-1-Expression in meningealen Gefäßen eines 10jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 49). (Anti-humanen Interleukin-1, pAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: a und b: 370x)

- a) Meningeales Gefäß mit IL-1-Expression in der Tunica media.
- b) Meningeales Gefäß mit deutlich erkennbaren IL-1-exprimierenden Myozyten in der Tunica media.

Abbildung 81: IL-1-Expression in den Kapillaren der grauen Substanz eines 10jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 49). (Anti-humanen Interleukin-1, pAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

Abbildung 82: IL-1-Expression in den Kapillaren der weißen Substanz eines 10jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 49). (Anti-humanen Interleukin-1, pAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 185x)

80a	80b
81	82



- Abbildung 83:** Graue Substanz des Großhirns eines 17jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 127). Die TNF- α -Expression ist in Form kleiner Pünktchen zu erkennen, die sich keiner bekannten anatomischen Struktur zuordnen ließen. (Anti-humaner TNF- α , pAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)
- Abbildung 84:** Grenzbereich von weißer zu grauer Substanz (Assoziationsfaserbereich) eines 17jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 127) mit einer bandförmigen, feingepunkteten TNF- α -Expression (Pfeil). (Anti-humaner TNF- α , pAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 93x)
- Abbildung 85:** Hippocampus eines 17jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 127) mit TNF- α -Expression in Form zahlreicher unterschiedlich großer Punkte, die sich lichtmikroskopisch keiner bekannten anatomischen Struktur zuordnen ließen. (Anti-humaner TNF- α , pAk, ABC-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

83

84

85

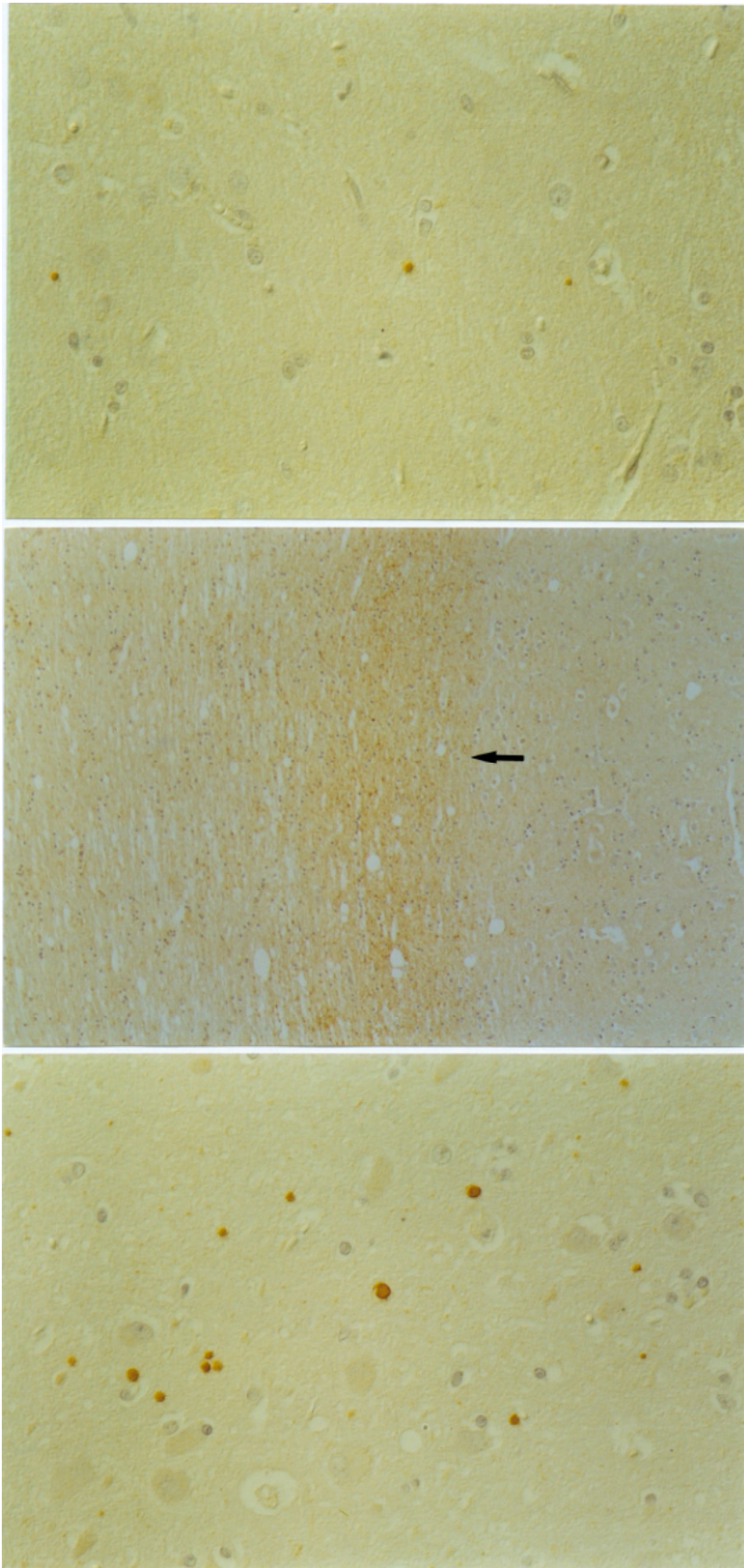
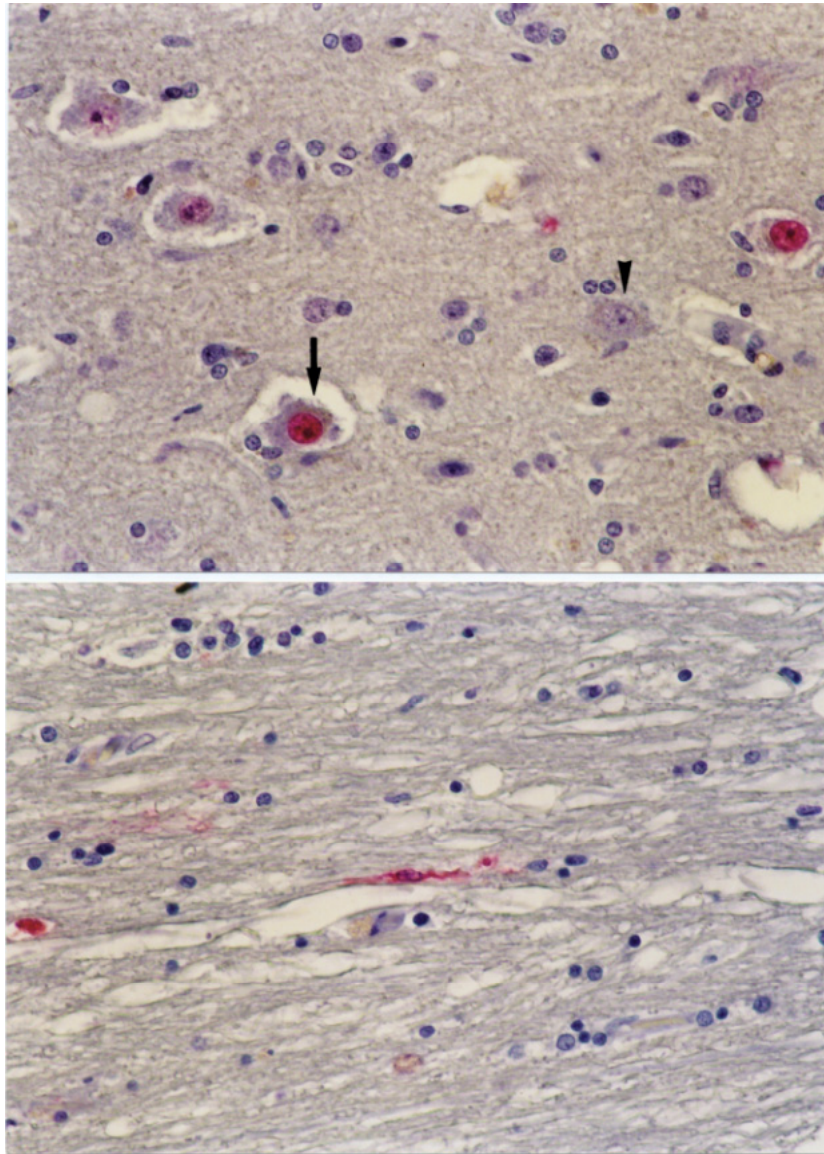


Abbildung 86: Gehirn eines 13jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 87) mit TUNEL-positiven Neuronenkernen (Pfeil) und TUNEL-negativen Neuronenkernen (Pfeilspitze) in der grauen Substanz. Die TUNEL-positiven Neuronenkern weisen keine morphologischen Anzeichen für Apoptose auf. (TUNEL-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

Abbildung 87: Gehirn eines 14jährigen Hundes mit Plaques (Nr. 88) mit einer TUNEL-positiven Zelle in der weißen Substanz, die morphologisch einer Mikrogliazelle ähnelt. (TUNEL-Methode, Paraffinschnitt, Vergrößerung: 370x)

86

87



5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, verschiedene histochemische und immunhistologische Methoden zum Nachweis von Plaques, neurofibrillären Bündeln und einer kongophilen Angiopathie im Gehirn des Hundes vergleichend zu untersuchen und darüber hinaus die Morphologie und Lokalisation der Veränderungen zu beschreiben und soweit möglich mit Verhaltensänderungen und kognitiven Dysfunktionen des alten Hundes zu korrelieren. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde das Verteilungsmuster des Amyloidvorläuferproteins, eine Gliazellaktivierung und die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie eine Neuronendegeneration unter Berücksichtigung der Plaquedichte untersucht.

5.1 Methodenvergleich

Im Rahmen des **Methodenvergleichs** wurden die immunhistologische Markierung des β A4-Proteins, fünf Silberfärbungen und die Kongorot-Färbung hinsichtlich Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Plaques im Hundehirn vergleichend untersucht. Es wurde deutlich, daß die immunhistologische Markierung der β A4-Proteinablagerungen in Plaques und Gefäßen im Vergleich mit den Versilberungstechniken die sensitivste Methode ist, d.h. sie detektierte die höchste Plaquedichte im Neuropil und stellte die gefäßassoziierten Ablagerungen in meningealen Gefäßen und Kapillaren der Großhirnrinde am deutlichsten dar. Die Immunhistologie wies bei 100% der alten Hunde (Gruppe 3, 10-18 Jahre) Plaques in unterschiedlicher Menge nach. Die höchste in der Immunhistologie ermittelte Plaquedichte betrug 250 Plaques/6,25 mm² bei einem 10jährigen Hund. Die erheblich höhere Sensitivität der immunhistologischen Darstellung ist wahrscheinlich auf die Vorbehandlung mit Ameisensäure zurückzuführen, die eine deutliche Antigendemaskierung im Gewebe bewirkt und so die Immunreaktivität der β A4-Proteinablagerungen erhöht (Kitamoto et al., 1987). Die Silberfärbungen stellten insgesamt weniger Plaques dar, und die Gefäßablagerungen waren weniger deutlich erkennbar. Es wurden einige bereits in früheren Studien für den Hund beschriebene Silberfärbungen, wie die nach Bielschowsky (modifiziert; Yamamoto et al., 1986; Shimada et al., 1991; Cummings et al., 1993, 1996) und Gallyas (Gallyas, 1971; Russel et al., 1992) benutzt. Darüber hinaus wurden neue, bisher nur in humanmedizinischen Studien angewandte Techniken wie die nach Campbell-Switzer (Braak und Braak, 1991), Reusche (Rosenwald et

al., 1993) und Bodian (Kondoh et al., 1993) eingesetzt. Die zum Nachweis von Plaques im Gehirn des Menschen beschriebene Campbell-Switzer-Methode lieferte unter den Silberfärbungen die besten Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und Spezifität des β A4-Proteinnachweises im Hundehirn. Mittels dieser Technik fanden sich bei 90% der Hunde aus Gruppe 3 (10-18 Jahre) Plaques im Gehirn. Die höchste darstellbare Plaquedichte betrug 200 Plaques/6,25 mm². Mit der Methode nach Reusche konnten bei 67% der Hunde aus Gruppe 3 (10-18 Jahre) Plaques gefunden werden, die maximal ermittelte Plaquedichte war 56 Plaques/6,25 mm². Mit diesen beiden Methoden wurden deutlich bessere und reproduzierbare Ergebnisse erzielt als mit der in der Literatur häufig verwendeten modifizierten Bielschowsky-Methode (Shimada et al., 1991; Kamiya et al., 1995; Hou et al., 1997). Diese Technik zeigte bei 60% der Hunde aus Gruppe 3 (10-18 Jahre) Plaques und es konnten maximal 48 Plaques/6,25 mm² gezählt werden. Die modifizierte Bodian-Methode konnte nur bei 10% der Hunde vereinzelte, schwer erkennbare Plaques nachweisen und die Technik nach Gallyas konnte ebenso wie die Kongorot-Färbung bei keinem der Hunde aus Gruppe 3 (10-18 Jahre) Plaques im Gehirn nachweisen. Die statistische Analyse der Ergebnisse (einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test) bestätigte die signifikanten Unterschiede zwischen den Methoden.

Die immunhistologischen Untersuchungen aller Hunde im Alter von einem Monat bis zu 18 Jahren zeigten, daß das Auftreten der Plaques im Hundehirn ein signifikant altersabhängiger Prozeß ist, der im 8. Lebensjahr beginnt. Von den acht bis zehnjährigen Hunden wiesen 46%, von den 11 bis 13jährigen Hunden 78% und von den 14 bis 18jährigen Hunden 91% Plaques auf. Die im Rahmen des Methodenvergleichs durchgeführte **Zählung der Plaques** zeigte große individuelle Unterschiede der Plaquedichte auf, die mit Schwankungen des Mittelwertes von 1 bis 149 Plaques pro 6,25 mm² einhergingen. Beispielsweise traten bei zwei 10jährigen Hunden 127 bis 148 Plaques/6,25 mm² auf und bei den 16jährigen Hunden 1 bis 11 Plaques/6,25 mm². Diese Ergebnisse machen deutlich, daß überraschenderweise die Plaquedichte im Gehirn der alten Hunde (Gruppe 3, 10-18 Jahre) nicht stetig mit steigendem Alter der Hunde zunimmt. Ein aufwendiges statistisches Verfahren, die Clusteranalyse (Deichsel und Trampisch, 1985), konnte bei den alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) fünf Hunde mit niedriger, 14 Hunde mit mittlerer und 11 Hunde mit hoher Plaquedichte aufzeigen, wobei sich Grenzen fanden bei ca. 2,5 und bei 40 Plaques/6,25 mm². Die Hunde mit geringer Plaquedichte waren durchschnittlich 14,3 Jahre alt, die mit mittlerer Plaquedichte 14,6 Jahre und die Hunde mit einer hohen Plaquedichte 13,5 Jahre alt. Gründe für diese

unterschiedlichen Plaquedichten auch bei Hunden desselben Alters könnten möglicherweise Rasseunterschiede oder familiäre genetische Prädispositionen sein. Wegiel et al. (1996) konnten mittels der Clusteranalyse zwei Subpopulationen in der Gruppe alter Hunde, die im Durchschnitt 19 Jahre alt waren, aufzeigen: eine mit vielen und eine mit sehr wenigen Plaques. In einer Gruppe von jüngeren, durchschnittlich 12 Jahre alten Hunden traten Plaques in mittlerer Anzahl auf. Als mögliche Ursache für die höhere Plaquedichte in einer Untergruppe der alten Hunde führen sie einerseits Rasseunterschiede und andererseits nicht näher definierte Umwelteinflüsse auf, denen Hunde mit einer im Alter auftretenden hohen Plaquedichte ausgesetzt waren. Gegen die von Wegiel et al. (1996) genannten, die Plaquebildung fördernden Umwelteinflüsse, sprechen die Ergebnisse von Russell et al. (1992), die im Gehirn von unter einheitlichen Bedingungen gehaltenen Labor-Beagles durchaus unterschiedliche Plaquedichten fanden. Andererseits beschreiben Russell et al. (1992), daß interessanterweise Wurfgeschwister im Alter gleiche Plaquedichten entwickeln. Dies weist auf eine mögliche genetische Prädisposition bezüglich der Ausbildung von Plaques im Alter hin. Die eigenen Ergebnisse geben keinen eindeutigen Hinweis auf eine Rassendisposition oder auf regionale Einflüsse, die das Auftreten von Plaques im Gehirn alter Hunde fördern. Aufgrund der Heterogenität der untersuchten Hunde bezüglich Rasse und Herkunft ist nur eine begrenzte Aussage möglich.

Insgesamt machen diese Ergebnisse deutlich, daß die Menge nachweisbarer Plaques im Hundehirn erstens abhängig ist von der gewählten Nachweismethode und zweitens von individuellen, nicht näher bestimmbaren Faktoren. In der Humanmedizin führten diese Erkenntnisse dazu, daß eine Kommission mit dem Namen CERAD ("Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease"; Mirra et al., 1991) strikte Kriterien bezüglich der Nachweismethoden, der Gehirnregionen und der Graduierung der Befunde aufstellte, damit eine eindeutige postmortale Diagnose möglich wird.

Mit keiner der angewandten Silberfärbungen konnten, in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (von Braunmühl, 1956; Russel et al., 1992; Uchida et al., 1992a und b; Cummings et al., 1993; Braak et al., 1994; Morys et al., 1994), die für alte und demente Menschen beschriebenen **neurofibrillären Bündel**, die sich aus intrazellulär abgelagertem, Mikrotubuli-assoziiertem, hyperphosphoryliertem Tau-Protein zusammensetzen, im Hundehirn gefunden werden. Wen et al. (1985) konnten elektronenmikroskopisch neurofibrilläre Strukturen in Neuronen eines Norwegischen Elchhundes darstellen. Diese entsprachen jedoch morphologisch nicht den Alzheimer-Fibrillen, sondern Fibrillen, die im Rahmen des Steele-

Richardson-Olszewski-Syndrom ("progressive supranuclear palsy") bei Menschen auftreten. Hierbei handelt es sich um unpaare, aus Tau-Protein bestehende Neurofibrillen mit einem Durchmesser von 15 μm und nicht wie bei der Alzheimer-Krankheit um paarige, helikal gewundene Neurofibrillen. Ein Autor beschreibt immunhistologisch Tau-positive Neuronen im Kortex eines alten Hundes (Uchida et al. 1992, 1993). Diese Neuronen enthalten vermutlich lösliches Tau-Protein. Die Tatsache, daß bisher noch nie mittels Versilberungstechniken ein positives intraneuronales Signal im Hundehirn gefunden wurde, unterstreicht die Annahme, daß es zwar Tau-Protein im Neuronenzytoplasma beim Hund gibt, dieses aber nicht kondensiert und keine wollknäulartig um den Zellkern gewickelten echten neurofibrillären Bündel bildet (Wegiel et al., 1998, Papaioannou et al., 2000).

Die im Methodenvergleich eingesetzte **Kongorot-Färbung** wies nur in den meningealen Gefäßen, nicht aber in den Kapillaren der grauen Substanz eine positive Reaktion auf. Die Plaques im Neuropil waren nicht anfärbbar. In den meningealen Gefäßen konnten Kongorot-positive βA4 -Proteinablagerungen bei 93% der alten Hunde mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen stimmen mit denen anderer Autoren überein, die eine zerebrale Amyloidangiopathie bei alten Hunden beschreiben (von Braunmühl, 1956; Dahme und Sprengler, 1976; Dahme und Schröder, 1979; Giaccone et al., 1990; Cummings et al., 1993). Die Tatsache, daß sich nur die gefäßassoziierten βA4 -Proteinablagerungen mittels der Kongorot-Färbung darstellen lassen, kann wie beim Menschen mit unterschiedlichen Konformationen der Isoformen des βA4 -Proteins in Plaques und Gefäßen begründet werden (Probst et al., 1991; Eikelenboom und Veerhuis, 1996; Kelly, 1997). Verschiedene Studien zeigen, daß das $\beta\text{A4}(42)$ -Protein die initial abgelagerte Form in Plaques und Gefäßen des Menschen und des Hundes darstellt (Tekirian et al. 1996; Cummings et al. 1996d). In humanen Plaques tritt das $\beta\text{A4}(40)$ -Protein später in ausgereiften klassischen/neuritischen Plaques auf (Fukumoto et al., 1996; Tekirian et al., 1996). Im Gegensatz hierzu fanden Cummings et al. (1996), die die Variabilität des COOH-Endes des βA4 -Proteins im Hundehirn untersuchten, nur $\beta\text{A}(42)$ -Protein-positive Plaques. Zusätzlich wurde in meningealen Gefäßen des Hundes Apolipoprotein E in Verbindung mit den βA4 -Proteinablagerungen gefunden, das *in vitro* die Ausbildung von Amyloidfibrillen fördert (Ma et al., 1994; Prior et al., 1995; Uchida et al., 1997). Obwohl *in vitro* Studien zeigten, daß das $\beta\text{A4}(42)$ -Protein insbesondere in Gegenwart von Apolipoprotein E leichter zu Amyloidfibrillen mit β -Faltblattstruktur aggregiert als das $\beta\text{A4}(40)$ -Protein (Jarret et al., 1993), scheint dies im Hundehirn nicht für eine Amyloidfibrillen-

Bildung auszureichen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigen das Fehlen von Amyloidfibrillen in den kaninen Plaques (Ishihara et al., 1991). Nur in den glatten Muskelzellen der Tunica media ließ sich aggregiertes β A4-Protein an der Basalmembran meningealer Gefäße nachweisen (Wegiel et al., 1995). Das Fehlen von Amyloidfibrillen in β -Faltblattstruktur in den Plaques, in die sich der Farbstoff Kongorot einlagern kann, erklärt, weshalb sich die kaninen Plaques nicht mit der Kongorot-Färbung darstellen lassen. Im Gegensatz hierzu erlauben die 6 bis 10 nm langen Amyloidfibrillen in den meningealen Gefäßen den Nachweis der Amyloidablagerungen mit der Kongorot-Färbung (Wegiel et al., 1995; Puchtler et al., 1962).

5.2 Neuropathologische Befunde beim alten Hund

Nach Kraft (1997) treten Hunde ab dem 6. bis 9. Lebensjahr in den **geriatrischen Lebensabschnitt** ein. Tiere in diesem Alter weisen eine Steigerung der „Multimorbidität“, d.h. der Krankheitshäufigkeit, auf. Hinsichtlich des Sterbealters von Hunden konnten Danckert und Kraft (1997) einen Einfluß der Größe bzw. der Hunderasse feststellen. Kleine Hunde (bis zu 15 kg Körpergewicht) sterben durchschnittlich mit 11 Jahren, mittelgroße Hunde (15-45 kg) mit 9 Jahren und sehr große Hunde (über 45 kg) mit durchschnittlich 7 Jahren. Die Hunde in der vorliegenden Untersuchung wiesen eine ähnliche Verteilung des Sterbealters auf. Bei den 8 und 9jährigen Hunden fanden sich noch zwei Hunde, die den großen Rassen zugerechnet wurden. Tiere ab dem 10. Lebensjahr gehörten den mittelgroßen Rassen und die ältesten Hunde mit 17 und 18 Jahren den kleinen Hunderassen mit einem Körpergewicht von unter 15 kg an. Die Untersuchung sehr alter Tiere war aufgrund der geringen Anzahl von zur Verfügung stehenden über 14jährigen Hunden nur eingeschränkt möglich. In diesem Zusammenhang zeigten Untersuchungen in England von Michell (1999), daß dort nur 26% der Hunde älter als 14 Jahre und nur 8% der Hunde älter als 15 Jahre wurden.

In den Gehirnen der alten Hunde mit und ohne Plaques (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) traten im Vergleich zu den jungen Hunden (Gruppe 1, 2-3 Jahre) keine auffälligen **makroskopischen Veränderungen** auf; insbesondere konnten in Übereinstimmung mit Reifinger et al. (1997) keine Großhirnrindenatrophie und keine Ausweitung der lateralen Ventrikel festgestellt werden, wie sie bei alten Menschen (Barron et al., 1976; Dekeban und Sadowsky, 1978; Perry und Kay, 1997) und in einigen tiermedizinischen Studien bei über 14 Jahre alten Hunden gefunden wurden (Su et al., 1998; Borrás et al., 1999).

Die Hirnatrophie des alten Menschen beruht auf einem Neuronenverlust (Anderson et al., 1983; Brody, 1992) und dem Schwund der periventrikulären weißen Substanz (Hubbard und Anderson, 1981a). Möglicherweise handelt es sich bei der in der Literatur nachgewiesenen Hirnatrophie alter Hunde um die Folge eines Hydrocephalus internus e vacuo, der sich aufgrund degenerativer bzw. regressiver Veränderungen der weißen Substanz oder einer verminderten Neuronenanzahl entwickelt (Reifinger et al., 1997).

Pathologisch-histologisch wurden die Gehirne alter Hunde mit und ohne Plaques (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) und die Gehirne der jungen Hunde (Gruppe 1, 2-3 Jahre) auf eine Fibrose der Meningen und des Plexus chorioideus, Lipofuszinablagerungen in Neuronen und perivaskuläre Makrophagen, Mikroblutungen in der grauen Substanz und axonale Sphäroide und sogenannte eosinophile Kügelchen in der weißen Substanz untersucht. In einem statistischen Gruppenvergleich konnte bei alten Hunden ohne Plaques (Gruppe 2, 11-14 Jahre) und alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) eine altersabhängige Fibrose des Plexus chorioideus und der Meningen, die sich durch eine Zunahme der Fibroblasten und kollagenen Fasern auszeichnete, im Vergleich zu jungen Hunden (Gruppe 1, 2-3 Jahre) festgestellt werden. Borrás et al. (1999) fanden ebenso eine altersabhängige Fibrose in den Meningen und dem Plexus chorioideus. Zusätzlich konnten sie herdförmige Verkalkungen in der Leptomeninge, die Psammoma-Körperchen ähnelten, nachweisen.

Weiterhin fanden sich in der **grauen Substanz** bei 100% der alten Hunde mit und ohne Plaques (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) Lipofuszin-haltige, perivaskuläre Makrophagen und bei 97% der alten Hunde Lipofuszinablagerungen im Zytoplasma von Neuronen. Diese Veränderungen traten bei keinem der jungen Hunde (Gruppe 1, 2-3 Jahre) auf. Die Lipofuszinablagerungen in den Neuronen, wie sie auch für alte Menschen beschrieben werden (Mann et al., 1978), treten als Zeichen der Gehirnalterung auf. Eine funktionelle Beeinträchtigung der Neuronen durch Alterungspigmente wurde nur für Neuromelanin in den Zellen der Substantia nigra beim Menschen, aber nicht für Lipofuszin beschrieben (Mann, 1974, 1978). Borrás et al. (1999) finden Lipofuszin in Neuronen auch bei jungen Hunden, aber hier nur in sehr geringer Menge. Bei 63% der alten Hunde mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) traten vereinzelte frische Mikroblutungen auf, die sich weder im Gehirn der alten Hunde ohne Plaques (Gruppe 2, 11-14 Jahre) noch im Gehirn der jungen Hunde (Gruppe 1, 2-3 Jahre) fanden. Als Ursache der Mikroblutungen kommt eine in der Agonie auftretende Hypoxie, die eine erhöhte Permeabilität der Kapillarwände bedingt, in Frage (Lee et al., 1999). Es ist in diesem Zusammenhang wichtig zu erwähnen, daß interessanterweise bei alten Hunden mit und ohne Plaques (Gruppe

2 und 3, 10-18 Jahre) ein positiver Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Mikroblutungen mit der Menge abgelagerten β A4-Proteins in den parenchymalen Kapillaren der grauen Substanz bestand. Die Mikroblutungen sind somit möglicherweise eine Folge der β A4-Proteinablagerungen in den parenchymalen Kapillaren der grauen Substanz, die dort zu einer Degeneration der Gefäßwand (Dahme und Sprengler, 1976) und in der Folge zu Blutungen führen können (Dahme und Schröder, 1979; Dahme, 1994). Bei alten Menschen werden hochgradige zerebrale Amyloidangiopathien im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit (Roses, 1996) und in stärkerem Maße als Folge erblicher Amyloidangiopathien (HCHWA-D, HCHWA-I), die mit tödlichen Massenblutungen einhergehen können, beobachtet (Mandybur, 1986; Benedikz et al., 1999; Maat-Schieman et al., 2000). In den statistischen Untersuchungen zeigten sich im Vergleich alter Hunde mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) zu alten Hunden ohne Plaques (Gruppe 2, 11-14 Jahre) keine Unterschiede hinsichtlich der genannten histo-pathologischen Befunde. Darüber hinaus gab es bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) keinen Zusammenhang zwischen den pathologisch-histologischen Befunden und der Plaquedichte.

In der **weißen Substanz** traten bei keinem jungen Hund (Gruppe 1, 2-3 Jahre), aber bei 54% der alten Hunde (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) axonale Sphäroide auf. Ebenso fanden sich bei keinem jungen Hund eosinophil gefärbte Kügelchen zwischen den Axonen, die bei 57% der alten Hunde (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) auftraten. Die intensiv eosinophil gefärbten Kügelchen ließen sich allerdings keiner anatomischen Struktur in der weißen Substanz eindeutig zuordnen. Auch hier traten keine Unterschiede zwischen den Befunden bei alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) und alten Hunden ohne Plaques (Gruppe 2, 11-14 Jahre) auf. Bei den alten Hunden gab es auch keinen Zusammenhang mit der Plaquedichte.

Möglicherweise handelt es sich bei den granulären Kügelchen um die gleichen Strukturen, die von Ferrer et al. (1993) und Borrás et al. (1999) als Ubiquitin-positives, granuläres, teils kugeliges Material zwischen den Axonen der weißen Substanz beschrieben wurde. Ferrer et al. (1993) favorisieren als Ursache der in Verbindung mit diesen Ubiquitin-positiven Kügelchen nachgewiesenen PAS-positiven und Galaktozerebrosid-haltigen, granulären Strukturen degenerative, altersabhängige Myelin- und Oligodendrozytenveränderungen. Newberne et al. (1960, 1962) beschreiben ähnliche granuläre Veränderungen in der Medulla oblongata von Hunden, die in Toxizitätsstudien untersucht wurden und führen diese ursächlich auf eine axonale Dystrophie zurück. Läsionen in der weißen Substanz des alten Menschen, die mit einer Gliose und Demyelinisierung einhergehen können, entwickeln sich zwar altersabhängig, aber unabhängig von Neuronenverlusten in der Großhirnrinde, also nicht in der Folge einer

axonalen Degeneration (Sawada et al., 2000). Als Ursache dieser degenerativen Veränderungen wird eine chronische Ischämie, die vor allem die periventrikuläre weiße Substanz betrifft, aufgeführt (Sawada et al., 2000).

5.3 Morphologische Charakterisierung der β A4-Proteinablagerungen

Immunhistologisch konnten **Plaques** erstmals bei einem achtjährigen Hund nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil von Hunden mit immunhistologisch nachweisbaren Plaques nahm in Abhängigkeit vom steigenden Alter von 46% bei acht- bis zehnjährigen Hunden bis auf 91% bei den 14- bis 18jährigen Hunden zu. Die kaninen Plaques entsprachen morphologisch den diffusen Plaques des Menschen, die sich im Gehirn alter, nicht-dementer Menschen ab dem 60. Lebensjahr und auch bei Alzheimer-Patienten entwickeln (Dickson et al., 1992).

Immunmorphologisch konnten zwei **Plaquetypen** unterschieden werden. Plaques vom Typ 1 waren unterschiedlich große, relativ gut abgegrenzte, kondensierte β A4-Protein-positive Herde im Neuropil von 30 bis zu 150 μ m Durchmesser. Dieser Plaquetyp trat in den oberflächlichen Kortexschichten 2 bis 4 auf und wies eine laminäre Verteilung entlang der Neuronschichten auf. Die Molekularschicht der Großhirnrinde wies keine Plaques auf. Plaques vom Typ 2 waren gekennzeichnet durch großflächige, wolkige β A4-Proteinablagerungen, die in der Tiefe der Großhirnfurchen in Kortexschicht 5 und 6 lagen. Es fanden sich bei keinem alten Hund neuritische Plaques mit einem kondensierten Amyloidkern und einem Kranz dystrophischer Neuriten. Diese neuritischen Plaques nehmen zahlenmäßig im Verhältnis zu den diffusen Plaques in den Gehirnen von Menschen, die eine neurodegenerative Erkrankung wie z. B. die Alzheimer-Krankheit aufweisen, stark zu (Langui et al., 1995). In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben über die nachgewiesenen Plaquetypen beim Hund, und es wird überdies eine uneinheitliche Nomenklatur benutzt. Wenige Autoren beschreiben Kongorot- und Thioflavin S-positive Plaques, die "primitive plaques" genannt werden und ein weiterentwickeltes Plaquestadium in Richtung der klassischen/neuritischen Plaques darstellen sollen (Wisniewski et al., 1970; Pauli und Luginbühl, 1971; Selkoe et al., 1987; Uchida et al., 1990; Shimada et al., 1991, 1992). Die meisten Autoren finden in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen nur diffuse, d.h. Kongorot- und Thioflavin S-negative Plaques (Giaccone et al., 1990; Russel et al., 1992; Uchida et al., 1992, 1993; Cummings et al., 1993;

Morys et al., 1994; Okuda et al., 1994), obwohl in einer Studie bis zu 26 Jahre alte Hunde untersucht wurden (Morys et al., 1994).

Darüber hinaus konnten in den eigenen Untersuchungen zwei **Muster** hinsichtlich der laminären Verteilung der Plaques in der Großhirnrinde unterschieden werden. Muster 1 wies eine Kombination von Typ 1-Plaques in den oberflächlichen Kortexschichten 2 bis 4 mit Typ 2-Plaques in den tiefen Kortexschichten 5 und 6 auf. Muster 2 zeichnete sich durch das alleinige Auftreten von Typ 2-Plaques in tiefen Großhirnrindenschichten aus. Von den 72 Hunden mit immunhistologisch nachweisbaren Plaques wiesen 43% das Muster 1 und 57% das Muster 2 auf. Die 8 bis 10jährigen Hunde wiesen zu 43% Muster 1 und zu 57% Muster 2 auf, die 11 bis 13jährigen zu je 50% Muster 1 und Muster 2 und die 14 bis 18jährigen Hunde wiesen zu 38% Muster 1 und zu 62% Muster 2 auf. Eine statistische Untersuchung konnte eine signifikante altersabhängige Zunahme des Auftretens von Muster 2 zeigen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beschreiben Satou et al. (1997), die eine Schnittebene auf Höhe des Lobus frontalis untersuchten, insgesamt vier laminäre Verteilungsmuster der kaninen Plaques. Muster 1 nach Satou et al. (1997) besteht aus vereinzelt diffusen Ablagerungen in tiefen Kortexschichten, Muster 2 aus zahlreichen diffusen Ablagerungen in Schicht 5 und 6, Muster 3 aus einer Kombination von kondensierten Plaques in oberflächlichen Schichten und diffusen Ablagerungen in tiefen Schichten und Muster 4 aus kondensierten Plaques in allen Schichten. Eigene Voruntersuchungen machten deutlich, daß in diesem Zusammenhang beachtet werden muß, daß sich das laminäre Verteilungsmuster der Plaques in Abhängigkeit von der betrachteten Schnittebene der Großhirnrinde und deren Rindenarchitektur ändert. In den eigenen Ergebnissen stellt das Muster 1 eine Zusammenfassung des Musters 3 und 4 und das Muster 2 eine Zusammenfassung des Musters 1 und 2 nach Satou et al. (1997) dar. Eine weitergehende Unterteilung der Verteilungsmuster der Plaques in vier Subtypen, wie von Satou et al. (1997) aufgezeigt, war nicht möglich. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Satou et al. (1997), die eine altersabhängige Verschiebung von Muster 1, d.h. von wenigen diffusen Ablagerungen in den tiefen Schichten, zu Muster 4 mit zahlreichen, kondensierten Ablagerungen in den oberen Schichten der Großhirnrinde im Gehirn alter Hunde fanden, trat in den eigenen Untersuchungen ein eher gegenläufiger Trend auf. In der Gruppe der 14 bis 18jährigen Hunde wiesen 38% Muster 1 und 62% Muster 2 auf. Eine mögliche Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist das heterogene Untersuchungsgut. Satou et al. (1997) untersuchten die Gehirne von Beagles aus Tierkolonien für Toxizitätsstudien und für die eigenen Untersuchungen lagen 45

Mischlingshunde und 93 reinrassige Hunde, die aber 34 unterschiedlichen Rassen angehörten, vor.

Bezüglich einer möglichen Prädisposition bestimmter **Hunderassen** für Plaques zeigten die Untersuchungen, daß 29 von 45 Mischlingen und 43 von 93 Rassehunden Plaques aufwiesen. Eine statistische Untersuchung machte deutlich, daß Mischlinge signifikant häufiger Plaques aufwiesen als die Rassehunde. Darüber hinaus wiesen die Mischlinge statistisch signifikant häufiger das Muster 2 (72%) im Vergleich zum Muster 1 (28%). Ein Einfluß der Hunderasse auf das Expressionsmuster der Plaques im Gehirn ist nicht eindeutig belegt, kann aber anhand der vorliegenden Ergebnisse auch nicht endgültig ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde beobachtet, daß sich die Plaques im Hundehirn häufiger in der Tiefe der Großhirnfurchen als in den oberflächlichen Hirnwindungen fanden. Dies spricht dafür, daß es möglicherweise, ähnlich wie beim Menschen, unterschiedliche Neuronengruppen gibt, in deren Umgebung Plaques bevorzugt auftreten (Brun et al., 1981; Clinton et al., 1993). Das Phänomen, daß es unterschiedlich empfindliche Neuronen gibt, die auf schädigende Einflüsse schneller reagieren als andere, ist in der Tiermedizin als Folge von Bleivergiftungen und einem Thiaminmangel beschrieben (Read et al., 1977; Hamir et al., 1984). Hierbei kommt es zu laminären neuronalen Nekrosen, die bei der Bleivergiftung die oberflächlichen Großhirnwindungen des frontalen und parietalen Kortex, aber nicht die Stammhirnregionen, und beim Thiaminmangel beispielsweise den parietalen und okzipitalen Kortex und Stammhirnregionen, aber nicht den Lobus piriformis, den Gyrus cinguli und den Hippocampus betreffen.

Die **topografische Verteilung** der Plaques im Gehirn von sechs Hunden mit hoher und sechs Hunden mit geringer Plaquedichte machte deutlich, daß Hunde mit geringer Plaquedichte diese fast ausschließlich im Lobus frontalis und temporalis (Gyrus cinguli) aufwiesen. Hunde mit hoher Plaquedichte zeigten Plaques in der gesamten Großhirnrinde und im Nucleus caudatus und Thalamus sowie ein bandartiges Signal im Hippocampus. In der weißen Substanz des Großhirns und im gesamten Kleinhirn traten nie Plaques auf. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß im Gehirn des alten Hundes der Lobus frontalis die Gehirnregion darstellt, in der β A4-Protein initial abgelagert wird und daß es erst später zur Bildung von Plaques in weiteren Kortexregionen wie dem Lobus temporalis und parietalis kommt. Erst in einem späteren Stadium treten dann auch Plaques in Stammhirnregionen auf. Berücksichtigt man, daß die Plaquedichte nicht streng mit zunehmendem Alter steigt, so ist der Befall unterschiedlicher Gehirnregionen möglicherweise nicht nur eine Frage der Zeit, sondern Folge anderer Kofaktoren, die zur Plaquebildung beitragen oder diese hemmen. In der Literatur finden

sich widersprüchliche Angaben über die Entstehung von Plaques in verschiedenen Gehirnregionen. Head et al. (2000) beschreiben das initiale Auftreten von Plaques im präfrontalen und entorhinalen Kortex und weisen auf Parallelen zu Befunden bei Alzheimer-Patienten hin. Im Gegensatz hierzu fanden Hou et al. (1997) Plaques im frontalen Kortex, aber nicht im entorhinalen Kortex und betonen deshalb die Unterschiede der regionalen Plaquesbildung bei Hund und Mensch. Die eigenen Befunde, die einen Schwerpunkt der Plaqueentstehung in neokortikalen Regionen aufweisen und die Tatsache, daß im Kleinhirn der alten Hunde im Gegensatz zu Alzheimer-Patienten nie Neuropil-assoziierte β A4-Proteinablagerungen auftraten, unterstreichen die Unterschiede zu den Befunden im Gehirn alter Menschen mit der Alzheimer-Krankheit, die im Verlauf der Erkrankung diffuse, großflächige β A4-Proteinablagerungen im Stratum moleculare des Kleinhirns entwickeln (Larner et al., 1997). Darüber hinaus ist für den Menschen unabhängig von der Topografie der Plaques im Gehirn vor allem das Verhältnis neuritischer zu diffusen Plaques wichtig, da zahlreiche neuritische Plaques nicht nur für eine Alterung des Gehirns, sondern für das Vorliegen einer Demenzerkrankung sprechen (Braak et al., 1986). Die topografische Verteilung der Plaques im Gehirn alter Hunde sowie die Tatsache, daß nur diffuse Plaques auftreten, sprechen dafür, daß die Veränderungen im Hundehirn mit denen alter, nicht-dementer Menschen, die zahlreiche, überwiegend diffuse Plaques im Kortex aufweisen, verglichen werden kann (Dayan, 1970; Dickson et al., 1992), daß es aber erhebliche Unterschiede gibt zu Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten.

Gefäßassoziierte β A4-Proteinablagerungen fanden sich in meningealen Arterien und parenchymalen Kapillaren in der Großhirnrinde erstmals bei einem 8jährigen Hund. Der prozentuale Anteil von Hunden mit immunhistologisch nachweisbaren meningealen β A4-Proteinablagerungen nahm in Anhängigkeit vom steigenden Alter von 20% bei den 8 bis 10jährigen Hunden auf 82% bei den 11 bis 13jährigen Hunden und 95% bei den 14 bis 18jährigen Hunden zu. Ähnlich verhielt es sich mit den β A4-Proteinablagerungen in den parenchymalen Kapillaren. Hier fanden sich bei 53% der 8 bis 10jährigen, bei 70% der 11 bis 13jährigen und bei 98% der 14 bis 18jährigen Hunde Ablagerungen in den Gefäßen. Neben der signifikanten Altersabhängigkeit des Auftretens gefäßassoziiierter β A4-Proteinablagerungen konnte mittels eines statistischen Gruppenvergleichs gezeigt werden, daß alte Hunde mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) mehr β A4-Proteinablagerungen in meningealen Gefäßen aufwiesen als alte Hunde ohne Plaques (Gruppe 2, 11-14 Jahre). Interessanterweise konnte aber zwischen der Intensität der Gefäßablagerungen und der Plaquedichte im Neuropil kein signifikanter

Zusammenhang aufgezeigt werden. Zusätzlich konnte kein eindeutiger räumlicher Zusammenhang zwischen den β A4-Proteinablagerungen in den Kapillaren und den Plaques aufgezeigt werden.

Eine kongophile Angiopathie zerebraler Gefäße wurde schon in früheren Arbeiten aufgezeigt (von Braunmühl, 1956; Pauli und Luginbühl, 1971; Dahme und Sprengler, 1976; Dahme und Schröder, 1979; Dahme, 1994), ohne daß allerdings ein Zusammenhang mit den Plaques diskutiert wurde. Im Gegensatz hierzu beschreiben Shimada et al. (1991) und Uchida et al. (1993) einige der wenigen Autoren, die klassische Plaques im Hundehirn fanden β A4-Protein-haltige Kapillaren innerhalb der kondensierten Plaqueformen und postulieren einen vaskulären Ursprung der Plaques, die hier durch eine Amyloid-induzierte Gefäßwanddegeneration entstehen sollen. Die eigenen Ergebnisse belegen, daß altersabhängig verstärkt gefäß-assoziierte β A4-Proteinablagerungen auftreten. Allerdings ist wichtig zu erwähnen, daß sich statistisch kein Zusammenhang zwischen der Intensität des abgelagerten β A4-Proteins in den meningealen und parenchymalen Gefäßen und der Plaquedichte zeigen ließ. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, daß sich zusätzlich auch keine räumliche Kollokalisierung der β A4-Protein-haltigen Kapillaren mit den Plaques in der grauen Substanz fand, ist ein primär vaskulärer Ursprung der Plaques unwahrscheinlich.

Im **Hippocampus** trat erstmals bei einem 10jährigen Hund ein bandförmiges, immunhistologisch positives Signal im Stratum moleculare auf. Der Prozentsatz alter Hunde mit einem Signal im Hippocampus nahm mit steigendem Alter von 15% bei den acht bis 10jährigen Hunden auf bis zu 74% bei den 14 bis 18jährigen Hunden zu. In statistischen Untersuchungen (T-Test) zeigte sich bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) ein positiver Zusammenhang zwischen der Plaquedichte im Kortex und dem Auftreten von β A4-Proteinablagerungen im Hippocampus.

In der Literatur gibt es bisher nur wenige Berichte über β A4-Proteinablagerungen im Hippocampus. Die Ursache für dieses Signal ist unklar, da es sich überraschenderweise nicht um Neuronen findet, sondern im Stratum moleculare, einer Schicht, die keine Neuronen aufweist. Cummings et al. (1995) postulieren, daß es sich bei diesem Signal möglicherweise um intrazellulär gelegenes β A4-Protein handelt, das hier in quer angeschnittenen Ausläufern von Neuronen der zweiten und dritten Schicht des entorhinalen Kortex sichtbar ist.

5.4 Pathogenese und Folgen der Plaques

Es war auffällig, daß sowohl die Plaques im Neuropil als auch die gefäßassoziierten β A4-Proteinablagerungen hoch signifikant mit steigendem Alter der Hunde ab dem 8. Lebensjahr zunahmen. Inwieweit die kaninen Plaques einen **neuronalen** oder **vaskulären Ursprung** haben, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es gab in den eigenen Untersuchungen einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen der neuronalen Amyloidvorläuferprotein ("amyloid precursor protein")-Expression und der Plaquedichte im Gehirn der alten Hunde. Dies und das laminäre Verteilungsmuster der Plaques in der Großhirnrinde sowie die Tatsache, daß sich häufig Neuronen innerhalb der Plaques fanden, deutet auf einen neuronalen Ursprung der Plaques hin. Gegen die von einigen Autoren (Uchida et al., 1993; Shimada et al., 1992, 1993) vertretene Hypothese, daß die Plaques des Hundes einen vaskulären Ursprung haben, spricht, daß sie sich räumlich getrennt in Regionen fanden, in denen zahlreiche β A4-Protein-positive Kapillaren auftraten. Eine statistische Auswertung inwiefern die Plaquedichte mit der Intensität der meningealen und parenchymalen Gefäßablagerungen zusammenhängt, lieferte darüber hinaus negative Ergebnisse, so daß eine primär vaskuläre Entstehung der Plaques unwahrscheinlich ist.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen, daß sich die diffusen Plaques im Hundehirn nicht oder nur in Einzelfällen im Rahmen eines hypothetischen, fortschreitenden **Plauekondensationsprozesses** zu klassischen, d.h. neuritischen Plaques mit Kongorot-positivem Amyloidkern weiterentwickeln. Insbesondere die Untersuchungen mittels der Kongorotfärbung machten deutlich, daß sich in den kaninen Plaques kein kongophiles Amyloid befindet. Cummings et al. (1996), Tekirian et al. (1996) und Wisniewski et al. (1996) untersuchten in diesem Zusammenhang die unterschiedlichen Isoformen des β A4-Proteins in den Plaques des Hundes und des Menschen. Sie konnten zeigen, daß im Gehirn des Menschen wie in dem des alten Hundes (Cummings et al., 1996) das β A4(42)-Protein die initial abgelagerte Isoform des β A4-Proteins in den diffusen Plaques ist. In den neuritischen Plaques des Menschen, die ein hypothetisch weiterentwickeltes, älteres Stadium der Plauekondensation darstellen, treten zusätzlich β A4(40)-Proteinablagerungen auf (Shinkai et al., 1995). Trotz der aus *in vitro* Versuchen bekannten Tatsache, daß das β A4(42)-Protein schneller zu Amyloidfibrillen aggregieren kann als das kürzere β A4(40)-Protein (Jarret et al., 1993), und obwohl Uchida et al. (1997) in kaninen Plaques zusätzliche Faktoren wie z.B. Apolipoprotein E und α -1-Antichymotrypsin fanden, die die Amyloidfibrillenaggregation *in vitro* zusätzlich fördern

(Ma et al., 1994), bilden sich keine neuritischen Plaques im Gehirn alter Hunde (Wisniewski et al., 1996). Gründe für diese Spezies-spezifischen Unterschiede hinsichtlich der Plaqueentwicklung sind möglicherweise verschiedene Zusammensetzungen bzw. Konzentrationen Plaque-assoziiierter Zellen und Proteine wie z.B. α -1-Antichymotrypsin, Apolipoprotein E und Heparan-Sulfat-Proteoglykan, die als Kristallisationskern dienen und die „Plaquereifung“ vorantreiben könnten (Tekirian et al., 1996).

In den eigenen Untersuchungen fand sich in der **grauen Substanz** der Großhirnrinde das **Amyloidvorläuferprotein** (APP) gleichermaßen in der Neuronenmembran junger Hunde (Gruppe 1; 2-3 Jahre) als auch alter Hunde (Gruppe 2 und 3; 10-18 Jahre). Allerdings wiesen alte Hunde mit Plaques (Gruppe 3; 10-18 Jahre) eine signifikant höhere neuronale APP-Expression in der Großhirnrinde auf als alte Hunde ohne Plaques (Gruppe 2; 11-14 Jahre). Darüber hinaus lag ein signifikanter, positiver Zusammenhang zwischen der neuronalen APP Expression und der Plaquedichte bei alten Hunden vor.

Die Aufregulierung des APP in Neuronen der grauen Substanz wird beim Menschen als Ursache für eine gesteigerte β A4-Proteinproduktion und die damit einhergehende Plaqueentstehung diskutiert (Rumble et al., 1989). Transgene Mäuse entwickeln beispielsweise im Vergleich zu normalen Artgenossen aufgrund einer Überexpression des humanen APP spontan auftretende, altersabhängige β A4-Proteinablagerungen (Lendon et al., 1997). Das vermehrt exprimierte APP auf Neuronen führt beim Hund möglicherweise zu einer Überlastung des proteolytischen Abbauweges und beschleunigt bzw. fördert so die Bildung des β A4-Proteins.

Inwiefern eine **Mikrogliazellaktivierung** in Verbindung mit den Plaques bei alten Hunden auftritt, wurde mittels immunhistologischer Markierung des MHC Klasse II-Antigens und des Lektins BS-1 untersucht. Die Markierung des **MHC Klasse II-Antigens** auf aktivierten Mikrogliazellen zeigte eine signifikante, altersabhängige Zunahme dieser Zellen in der grauen Substanz der alten Hunde (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) im Vergleich zu den jungen Hunden (9 Monate). In statistischen Untersuchungen konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen und der Plaquedichte gefunden werden. Das biotinierte **Lektin BS-1** markierte Mikrogliazellen und Endothelzellen im Hundehirn (Kiatipattanasakul et al., 1998; Gröne et al., 2000). Es fand sich auch hier eine deutliche altersabhängige Zunahme perivaskulär gelegener Mikrogliazellen mit großblasigem Zytoplasma in der grauen Substanz bei alten Hunden mit und ohne Plaques (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre), die die Ergebnisse der MHC Klasse 2-Markierung am Gefrierschnitt bestätigte. Im

Rahmen einer statistischen Auswertung konnte bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) keine Korrelation zwischen der Plaquedichte und der Anzahl BS-1 positiver Zellen aufgezeigt werden.

Bisher finden sich in der Literatur keine Angaben über eine mögliche Mikrogliazellaktivierung durch Plaques im Gehirn des alten Hundes. Borrás et al. (1999) konnten im Gehirn alter Hunde keine Veränderungen bezüglich der Mikrogliazellpopulation finden, wobei sie keine immunhistologischen Studien durchführten. Die Ergebnisse zeigen, daß die diffusen Plaques im Gehirn des alten Hundes keine Mikrogliaaktivierung auslösen, wie dies im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit (Haga et al., 1989; Eikelenboom und Veerhuis, 1996; Sasaki et al., 1997; Overmyer et al., 1999) beim Menschen beschrieben wird. In humanmedizinischen Untersuchungen wird den Mikrogliazellen eine große pathogenetische Rolle im Rahmen des Plaquekondensationsprozesses zugesprochen (Giulian, 1999). Mikroglia kann das Plaqueamyloid phagozytieren (Frackowiak et al., 1992) und produziert pro-inflammatorische Zytokine (Griffin et al., 1998), insbesondere Interleukin-1 (Griffin et al., 1994, 1995) und Interleukin-6 (Hüll et al., 1995, 1996), die beim Menschen vermutlich ein chronisches Entzündungsgeschehen auslösen, das die Plaquekondensation von der frühen, diffusen Form in die ausgereifte, klassische bzw. neuritische Form vorantreibt (Sheng et al., 1997).

Innerhalb der eigenen Untersuchungen fand sich keine altersabhängige **Astrogliose**, die durch eine Zunahme der Astrozytenanzahl gekennzeichnet ist in der grauen Substanz, wie sie von Borrás et al. (1999) und Shimada et al. (1992) beschrieben wird. Darüber hinaus konnte, auch mittels einer zu diesem Zwecke durchgeführten Doppelmarkierung, keine Kolo-kalisation von Plaques und Astrozyten in der grauen Substanz gefunden werden. Auch statistische Untersuchungen zeigten keine Korrelation zwischen der Astrozytenanzahl und der Plaquedichte auf.

Nakamura et al. (1997) finden im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen reaktive Astrozyten in kaninen Plaques und postulieren, daß eine Astrozytenreaktion nötig ist, um die Plaquekondensation auszulösen. Beim Menschen werden zusätzlich zu einer Mikrogliaaktivierung, in Abhängigkeit von der Plaqueform, reaktive Astrozyten beschrieben (Pike et al., 1995a).

Inwieweit die Plaques beim alten Hund die Expression **pro-inflammatorischer Zytokine** induzieren, sollte durch die immunhistologische Darstellung von IL-1, IL-6, IL-12 und TNF-

α aufgezeigt werden. Eine altersabhängige Zunahme des IL-1 in den meningealen Gefäßen und den Kapillaren der grauen Substanz konnte bei alten Hunden mit und ohne Plaques (Gruppe 2 und 3; 10-18 Jahre) im Vergleich zu jungen Hunden (Gruppe 1; 2-3 Jahre) nachgewiesen werden. Darüber hinaus fand sich bei den alten Hunden mit Plaques (Gruppe 3, 10-18 Jahre) ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Interleukin-1-Expression in den Kapillaren der grauen Substanz und der Plaquedichte. Interleukin-6 und Interleukin-12 konnten nicht nachgewiesen werden. TNF- α fand sich mit zunehmendem Alter als punktförmiges Signal in allen Schichten der grauen Substanz bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre), aber nicht bei jungen Hunden (Gruppe 1, 2-3 Jahre). Darüber hinaus fand sich solch ein aus zahlreichen Pünktchen bestehendes Signal im Hippocampus der alten Hunde (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre), das bei keinem der jungen Hunde auftrat (Gruppe 1, 2-3 Jahre). Die Zunahme der TNF- α -Expression bei alten Hunden mit und ohne Plaques (Gruppe 2 und 3; 10-18 Jahre) trat unabhängig von der Plaquedichte und nicht an die Lokalisation der Plaques gebunden auf. Keines der nachgewiesenen Zytokine fand sich in oder um die diffusen Plaques in der grauen Substanz.

Über eine Plaqueinduzierte oder -assoziierte Zytokinexpression im Gehirn alter Hund gibt es bisher keine Untersuchungen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Plaques keine direkte lokale Immunreaktion mit einer Expression pro-inflammatorischer Zytokine auslösen. In statistischen Untersuchungen konnte aber ein positiver Zusammenhang zwischen der Interleukin-1-Expression in den Kapillaren der grauen Substanz und der Plaquedichte aufgezeigt werden. Im Gegensatz hierzu konnte im Gehirn des Menschen durch Doppelmarkierungsversuche gezeigt werden, daß die Plaques in Abhängigkeit von ihrer Form eine unterschiedliche Anzahl aktivierter Mikrogliazellen und Astrozyten enthalten (Griffin et al., 1995, 1998), die Zytokine, insbesondere Interleukin-1 und -6 produzieren (Mc Geer et al., 1994). Der positive Zusammenhang zwischen der Plaquedichte und der Interleukin-1-Expression in den Kapillaren der grauen Substanz ist wahrscheinlich mehr durch die gleichzeitig mit zunehmender Plaquedichte steigenden, gefäßassoziierten β A4-Proteinablagerungen bestimmt, als alleine durch die Plaques im Neuropil. Die in der grauen Substanz nachweisbare altersabhängige Zunahme der TNF- α -Expression hat möglicherweise einen neuroprotektiven Effekt auf die umliegenden Neuronen. *In vitro* Versuche zeigten, daß neuronale Zellen durch TNF- α angeregt werden, vermehrt Bcl-2, ein Molekül, das neuronale Apoptose unterbindet, zu bilden (Tarkowski et al., 1999).

In den Gehirnen der alten Hunde (Gruppe 2 und 3; 10-18 Jahre) konnte eine altersabhängige Zunahme **TUNEL-positiver Neuronen** in der Großhirnrinde im Vergleich zu den jungen Hunden (Gruppe 1; 2-3 Jahre) aufgezeigt werden. Interessanterweise lagen die TUNEL-positiven Neuronen zahlreicher in der Tiefe der Großhirnfurchen vor als in der Oberfläche der Großhirnwindungen. Dies entspricht der bevorzugten Lokalisation der diffusen Plaques. Aufgrund der Tatsache, daß sich statistisch keine Korrelation zwischen der Anzahl TUNEL-positiver Neuronen und der Plaquedichte fand, kann ein ursächlicher Zusammenhang nicht abschließend beurteilt werden. Es konnten im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kiatipattanasakul et al. (1996) auch bei alten Hunden mit zahlreichen TUNEL-positiven Neuronen keine eindeutigen morphologischen Anzeichen im HE-Präparat für Apoptose an diesen Zellen festgestellt werden, wie z.B. ein geschrumpftes, eosinophiles Zytoplasma, halbmondförmige Chromatinkondensation und apoptotische Kernkörperchen (Granville et al., 1998).

Daß die Rate TUNEL-positiver Zellen vom Grad postmortalen Autolyse und der Fixationsart bzw. -zeit des Gehirngewebes beeinflusst wird, wie es Borrás et al. (2000) zu bedenken geben, kann nicht ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang konnten Borrás et al. (2000) anhand eines für das zu untersuchende Gewebe entwickelten „Autolyseindex“ zeigen, daß durch Autolyse eine höhere Rate nukleärer DNA-Fragmentationen in Neuronenkernen nachweisbar ist. Gleichzeitig beschreiben sie aber ebenso wie die eigenen Ergebnisse, daß sich sehr wenige TUNEL-positive Zellen bei jungen Hunden, unabhängig vom Erhaltungszustand des Gewebes, fanden. Möglicherweise sind bestimmte Neuronensubpopulationen im Gehirn alter Hunde anfälliger für eine postmortale DNA-Fragmentation. Trotz dieser nicht geklärten Ursachen für eine erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Neuronen bei alten Hunden korrelierten diese in einer Studie mit einer zunehmenden „Demenz“ der alten Hunden (Kiatipattanasakul et al., 1996). Untersuchungen, inwiefern möglicherweise als Folge der erhöhten DNA-Instabilität in Neuronen auch tatsächlich Neuronenverluste auftreten, liefern widersprüchliche Ergebnisse. Ball et al. (1983), die bis zu 16 Jahre alte Hunde (Beagle) untersuchten, fanden keinen Hinweis auf Neuronenverluste im Gehirn alter Hunde. Dagegen konnten Morys et al. (1994) bei über 17 Jahre alten Hunden erstaunlicherweise einen regional auf das Claustrum begrenzten Neuronenverlust aufzeigen, wenn dort gleichzeitig Plaques vorlagen. In diesem Zusammenhang erscheint die eigene Beobachtung wichtig, daß innerhalb der diffusen Plaques häufig morphologisch intakt erscheinende Neuronen erkennbar waren. Die Ursache der beobachteten Verhaltensänderungen und der von Kiatipattanasakul et al. (1996) beschriebenen, zunehmenden „Demenz“ der alten Hunde sind somit möglicherweise nicht durch einen Neuronenverlust, sondern durch eine Neuronendegeneration bestimmt, die mit einer Zunahme

der DNA-Brüchigkeit, eventuell verbunden mit einem Synapsenverlust (Samuel et al., 1994) und einer verminderten Neurotransmitterbildung (Ossowska et al., 1993; Kelly et al., 1996), wie es beim Menschen beschrieben wird, einhergeht.

In der **weißen Substanz** der Großhirnrinde trat interessanterweise eine signifikante, altersabhängige Zunahme segmental dilatierter, **Amyloidvorläuferprotein (APP)**-positiver Axone bei den alten Hunden mit und ohne Plaques (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) im Vergleich zu den jungen Hunden (Gruppe 1, 2-3 Jahre) auf. In statistischen Untersuchungen trat zwischen der Anzahl APP-positiver Axone in der weißen Substanz und der Plaquedichte in der grauen Substanz kein Zusammenhang auf.

Die altersabhängige Zunahme APP-positiver, unterschiedlich großer Sphäroide in der weißen Substanz war eine überraschende Beobachtung in der vorliegenden Studie. Humanmedizinische Arbeiten konnten zeigen, daß bei Patienten mit einem starken Schädel-Hirn-Trauma oder in der Folge von Ischämien zahlreiche APP-positive Axone in der weißen Substanz auftreten (Gentleman et al., 1993). APP wird im Neuronenkörper hergestellt und unterliegt dann einem anterograden, axonalen Transport. In normalen Axonen reicht die Konzentration des APP nicht für eine immunhistologische Darstellung aus. Nur in den Lokalisationen der Axone, die aufgrund der zusammengebrochenen Zytoarchitektur eine Störung des axoplasmatischen, Mikrotubuli-assoziierten APP-Transports und eine Akkumulation des APPs aufweisen, wird das APP-Signal immunhistologisch sichtbar (Kawarabayashi et al., 1993). Die APP-Markierung eignet sich somit beim Hund in Analogie zum Menschen sehr gut, um frühe axonale Schäden im ZNS, die infolge des Alterungsprozesses, aber möglicherweise auch eines Traumas oder einer Hypoxie auftreten, nachzuweisen.

In der weißen Substanz trat eine altersabhängige Zunahme **aktivierter MHC Klasse II- und BS-1-positiver Mikrogliazellen** bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) im Vergleich zu den jungen Hunden (Gruppe 1, 2-3 Jahre bzw. 9 Monate) auf. Insgesamt lagen erheblich mehr aktivierte MHC Klasse II-exprimierende Mikrogliazellen in der weißen als in der grauen Substanz des Großhirns vor. Interessanterweise trat ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl MHC Klasse II-positiver Mikrogliazellen in der weißen Substanz mit der Plaquedichte in der grauen Substanz auf.

Die altersabhängige Zunahme aktivierter Mikrogliazellen in der weißen Substanz der alten Hunde mit und ohne Plaques (10-18 Jahre) tritt möglicherweise als Folge degenerativer Veränderungen in der weißen Substanz auf. Die Zunahme von eosinophilen Kügelchen zwischen

den Axonen, die der von Ferrer et al. (1993) beschriebenen Ubiquitin-positiven Granula ähneln, und die zunehmende Anzahl degenerierter Axone sprechen für degenerative Veränderungen in der weißen Substanz bei alten Hunden. Die zur Phagozytose befähigten Mikrogliazellen werden wahrscheinlich durch den Gewebedebris direkt aktiviert (Giulian, 1999). Eine Zunahme der Mikrogliazellen in der weißen Substanz, die anscheinend rein altersabhängig ist, wird auch im Gehirn alter Affen beschrieben (Sheffield und Berman, 1998; Sloane et al., 1999). Eine hinreichende Erklärung für den positiven Zusammenhang zwischen der Plaquedichte in der grauen Substanz und der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen in der weißen Substanz läßt sich nicht finden. Eine Hypothese wäre ein möglicher primärer Neuronenuntergang in der grauen Substanz, der in der Folge eine sekundäre axonale Degeneration in der weißen Substanz nach sich zieht und so die Mikrogliazellaktivierung auslöst. Insgesamt muß dieses Ergebnis aber aufgrund der geringen Anzahl auf eine MHC Klasse II-Expression untersuchter Gehirne vorsichtig beurteilt werden.

Ein sehr auffälliger Befund waren die **Astrozyten** in der weißen Substanz der alten Hunde mit und ohne Plaques (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre), die im Vergleich zu denen der jungen Hunde (Gruppe 1, 2-3 Jahre) eine hochgradige Zunahme des sauren Gliafaserproteins im Zytoplasma zeigten und einen großen, dicken Zelleib mit langen, kräftigen Zellausläufern aufwiesen. Die immunhistologischen Untersuchungen zum Nachweis einer Vimentin-Expression in diesen Astrozyten verlief mit negativem Ergebnis. Es war bei einigen alten Hunden eine Häufung von Astrozyten in den tiefen, zentral gelegenen Bereichen der weißen Substanz und in der außen gelegenen Grenzschrift von weißer zu grauer Substanz, in der die sogenannten Assoziationsfasern verlaufen, vorhanden, ähnlich wie dies Shimada et al. (1992) und Borrás et al. (1999) beschreiben.

Diese Häufung von Astrozyten in der Grenzschrift von weißer zu grauer Substanz, wie sie auch für alte Menschen beschrieben wird (Beach et al., 1989), wird vermutlich weniger von den Plaques als möglicherweise von altersabhängigen, degenerativen Veränderungen in der weißen Substanz beeinflusst. Die beschriebene Hypertrophie der Astrozyten kann als Alterungsphänomen dieser Zellen gedeutet werden, wie dies bei alten Menschen (Beach et al., 1989), Mäusen (Bronson et al., 1993) und Affen (Sloane et al., 2000) beschrieben wurde. Die Tatsache, daß diese hypertrophen Astrozyten Vimentin-negativ waren, zeigt, daß sie trotz ihrer auffälligen Morphologie, sich funktionell nicht in einer Streßsituation mit erhöhter Stoffwechselaktivität befinden. Die Koexpression von GFAP und Vimentin in Astrozyten, wie es

für Astrozyten im Rattengehirn nach experimenteller Gehirnverletzung beschrieben wurde, soll auf eine erhöhte Aktivität der Zellen hindeuten (Calvo et al., 1991).

Die Untersuchungen bezüglich der Expression **pro-inflammatorischer Zytokine** zeigte bei den alten Hunden (Gruppe 2 und 3, 10-18 Jahre) ein bandartiges TNF- α -Signal in den Assoziationsfaserbereichen, d.h. der Grenzschicht zwischen weißer und grauer Substanz. Bei keinem der jungen Hunde (Gruppe 1, 2-3 Jahre) trat in diesem Bereich ein Signal auf.

Eine mögliche Quelle des TNF- α in dieser Grenzschicht könnten die hier zahlreich vorliegenden hypertrophen Astrozyten sein. Gröne et al. (2000) beschreiben in diesem Zusammenhang mittels Doppelmarkierungsversuchen in Gehirnen von an Staupe erkrankten Hunden eine TNF- α -Expression in Astrozyten, die das positive Signal erklären könnte. Inwieweit in der weißen Substanz infolge der TNF- α -Produktion eine direkte Schädigung des Myelins oder der Oligodendrozyten auftritt (Kita et al., 2000) bleibt unklar.

Eine **Korrelation zwischen klinischen und neuropathologischen Befunden** beim alten Hund erwies sich als sehr schwierig. Die Erhebung anamnestischer Daten hinsichtlich einer kognitiven Dysfunktion und/oder einer Verhaltensänderung bei alten Hunden war aufgrund des geringen Rücklaufs von Fragebögen schwierig. Aus den von 10 Hunden im Alter von 12 bis zu 18 Jahren vorliegenden Daten wurde deutlich, daß 100% dieser Hunde eine Abnahme der Lebhaftigkeit im Alter zeigten, 90% zeigten zunehmende Bewegungsunlust, 40% Zurückziehen aus der gewohnten Umgebung, 30% vermehrtes, unmotiviertes Bellen, gesteigerte nächtliche Unruhe, 20% zunehmenden Ungehorsam, Urininkontinenz und ein gesteigertes Schlafbedürfnis am Tag. Einzelne Hunde wiesen eine zunehmende Desorientierung, einen Verlust erlernter Fähigkeiten, eine zunehmende Gleichgültigkeit gegenüber der Umwelt, eine gesteigerte Rast- und Ruhelosigkeit am Tag sowie eine vermehrte Angst- und Schreckhaftigkeit und langes Starren in eine Ecke auf.

Über die eigenen Ergebnisse hinaus beobachteten andere Autoren in Verhaltenstests an vortrainierten Hunden eine positive Korrelation zwischen der Plaquedichte (" β -amyloid load") im Gehirn und dem Grad der kognitiven Dysfunktion bei alten Hunden (Cummings et al., 1996; Head et al., 1998). In den eigenen Untersuchungen wiesen zwar alle Hunde mit den beschriebenen Verhaltensänderungen Plaques in unterschiedlicher Menge auf, eine eindeutige Zuordnung der Verhaltensänderungen zu der Plaquedichte oder der Lokalisation der Plaques in bestimmten Gehirnregionen, wie es Head et al. (1998) postulieren, konnte aber nicht aufgezeigt werden. Cummings et al. (1993) heben in diesem Zusammenhang hervor, daß der Hund

möglicherweise im Gegensatz zum Menschen (Goldmann et al., 1986; Mori und Ihara, 1991; Braak et al., 1996) kognitive Dysfunktionen alleine aufgrund der Plaques, ohne die Beteiligung neurofibrillärer Bündel in Neuronen, entwickeln kann.

In humanmedizinischen Untersuchungen gibt es eine kontroverse Diskussion über die Zuordnung der klinischen Symptome zu der Anzahl nachgewiesener seniler Plaques oder neurofibrillärer Bündel. Früher wurden für die postmortale Diagnose einer Demenz vom Alzheimer-Typ die Kriterien nach Khachaturian (Khachaturian, 1985) angewandt. Hierbei handelte es sich um eine bestimmte Plaqueanzahl pro mm² im Kortex, die vorhanden sein mußte, damit die Diagnose der Alzheimer-Krankheit gestellt werden konnte. Die Nachweismethoden, bestimmte Gehirnregionen und das Auftreten neurofibrillärer Bündel bleiben unberücksichtigt. Weitere Studien konnten zeigen, daß die Plaquedichte nicht so gut mit dem Grad der kognitiven Ausfallserscheinungen korreliert wie die Anzahl neurofibrillärer Bündel (Langui et al., 1995). Heute besteht weitgehender Konsens darüber, daß hochgradige kognitive Ausfälle, wie sie bei Alzheimer-Patienten beschrieben werden, nur durch einen Neuronenverlust ausgelöst werden können, der wahrscheinlich zu einem größeren Anteil durch intraneuronale, neurofibrilläre Bündel als durch Plaques verursacht wird. Heute gelten die Kriterien des CERAD ("Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease"; Mirra et al., 1991), die eine graduelle Einteilung der Alzheimer-Erkrankung in sechs Stadien nach Braak und Braak (1991a, 1996a und b) nur aufgrund der Anzahl und Lokalisation der neurofibrillären Veränderungen zulassen.

Zusammenfassend wird aufgrund der vorliegenden Ergebnisse deutlich, daß sich im Gehirn alter Hunde **neuropathologische Veränderungen** finden in Form diffuser Plaques und einer zerebralen Amyloidangiopathie, die in ihrem Ausmaß und ihrer Verteilung den Veränderungen alter Menschen entsprechen. Die mittels Spezialfärbungen und Immunhistologie zahlreich in den Gehirnen alter Hunde nachgewiesenen Plaques, die im HE-Präparat nicht zu erkennen sind, entsprachen morphologisch den diffusen Plaques des Menschen, die als initiales Stadium der Plaqueentwicklung auftreten. Es konnten allerdings keine klassischen bzw. neuritischen Plaques und zu der sogenannten Alzheimer-Trias gehörende neurofibrilläre Bündel im Gehirn alter Hunde nachgewiesen werden. Die **topografische Verteilung** der Plaques in unterschiedlichen Großhirnregionen in Abhängigkeit von der Plaquedichte machte deutlich, daß der Lobus frontalis als erste Gehirnregion Plaques aufweist. In einem späteren Stadium sind weitere Großhirnregionen betroffen, insbesondere der Lobus limbicus mit Gyrus cinguli, und erst in Verbindung mit einer sehr hohen Plaquedichte in der Großhirnrinde treten auch

Plaques in Stammhirnregionen auf. Unabhängig von der Plaquedichte im Großhirn alter Hunde traten nie Plaques im Kleinhirn auf. Hinsichtlich der **Pathogenese** der kaninen Plaques sprechen das laminäre Verteilungsmuster in der Großhirnrinde, die erhöhte APP-Expression in Neuronen bei alten Hunden mit Plaques und das häufige Auftreten von Neuronen innerhalb der Plaques für einen neuronalen Ursprung des β A4-Proteins beim Hund. Die Entstehung der gefäßassoziierten β A4-Proteinablagerungen scheint begleitend zu den Plaques im Neuropil aufzutreten, ist aber wahrscheinlich an deren Entstehung nicht direkt beteiligt. Im Gegensatz zu humanmedizinischen Studien fand sich keine mit den Plaques assoziierte **Astrozyten- und Mikrogliazellreaktion**. Dies könnte erklären, weshalb sich die diffusen Plaques des Hundes nicht zu neuritischen Plaques weiterentwickeln, da im Hundehirn bestimmte, von Gliazellen produzierte Faktoren wie Zytokine oder Akute-Phase-Proteine, die als Entzündungsmediatoren die Plaquekondensation vorantreiben könnten, fehlen. Möglicherweise gibt es auch andere Spezies-spezifische Unterschiede hinsichtlich der Enzymaktivität im APP-Metabolismus, oder aber die Lebenszeit der Hunde reicht nicht aus, damit sich neuritische Plaques bilden können (Cummings et al., 1996). Eine mögliche **Plaque-induzierte Neuronendegeneration** im Hundehirn, die die Verhaltensänderungen einiger alter Hunde aus der Studie hätte erklären können, wurde ansatzweise durch den Nachweis einer zunehmenden DNA-Brüchigkeit in Neuronen gezeigt. Interessanterweise traten diese Neuronenveränderungen gehäuft in der Tiefe der Großhirnwindungen auf, also in Plaque-reichen Regionen der Großhirnrinde. Zu berücksichtigen ist aber die Tatsache, daß sich innerhalb der diffusen Plaques immer wieder morphologisch intakte Neuronen fanden. Das im Hundehirn nicht in β -Faltblattstruktur vorliegende und damit wahrscheinlich nicht neurotoxische β A4-Protein schädigt offensichtlich die Neuronen des alten Hundes nicht so stark, wie es beispielsweise die intraneuronal gelegenen, neurofibrillären Bündel beim Menschen tun. Interessanterweise traten die in der **weißen Substanz** des Gehirns alter Hunde zahlreichen APP-positive Axonsegmente, aktivierten Mikrogliazellen und hypertrophen Astrozyten in Verbindung mit einer erhöhten TNF- α -Expression auf, die auf eine bisher so noch nicht beschriebene, altersabhängige Degeneration der weißen Substanz hindeuten. Inwieweit die Läsionen in der weißen Substanz zu dem klinischen Bild beitragen, ist bisher ungeklärt und gibt Anlaß für weitere Untersuchungen.

Zahlreiche humanmedizinische Studien über den Alterungsprozeß des Gehirns einerseits und die Pathogenese von altersabhängig gehäuft auftretenden, neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit andererseits machen deutlich, daß es große Überschneidungen hinsichtlich der morphologischen Befunde im Gehirn gibt. Letztendlich ist beim Menschen

eine Abgrenzung der Veränderungen, die im Alterungsprozeß des Gehirns und im Verlauf neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, häufig nur durch Einbeziehen des Ausmaßes und der Qualität der kognitiven Dysfunktionen möglich. Trotz der teilweise enorm hohen Plaque-dichten im Gehirn einiger alter Hunde ist die klinisch-neuropathologische Korrelation der Befunde schwierig. Die diffusen Plaques des alten Hundes treten eindeutig als Zeichen des Alterungsprozesses im Gehirn auf und stellen ein initiales Stadium der Plaqueentstehung dar, das Einblicke in mögliche pathogenetische Abläufe zerebraler β -Amyloidosen des Menschen und anderer Tierspezies ermöglicht.

6 Zusammenfassung

1. Im Literaturteil werden die unterschiedlichen Amyloidtypen und Amyloidoseformen, sowie das pathogenetische Grundprinzip der Amyloidentstehung dargestellt, und es wird ein kurzer Überblick über die Nachweismethoden für Amyloid im Gehirn und in Organen von Mensch und Tieren gegeben. Darüber hinaus werden alterungsbedingte Gehirnveränderungen des Menschen unter besonderer Berücksichtigung der Pathogenese und der Folgen der Alzheimer-Krankheit beschrieben. Weiterhin wird der bisherige Kenntnisstand altersabhängiger Gehirnveränderungen des Hundes und anderer Tierspezies dargestellt.
2. Für die Untersuchungen lagen insgesamt 138 Rasse- und Mischlingshunde im Alter von 1 Monat bis zu 18 Jahren vor, die in einem Zeitraum von vier Jahren (1996-1999) gesammelt wurden. Alle Hunde wurden seziert, das Gehirn wurde entnommen und für 10 Tage in 10%igem Formalin fixiert und in 8 Schnittebenen aufgearbeitet. Für die histochemischen und immunhistologischen Untersuchungen wurden Paraffinschnitte und für den immunhistologischen Nachweis MHC Klasse II-positiver Mikrogliazellen Gefrierschnitte verwandt. Darüber hinaus wurde ein selbsterstellter Fragebogen an die Tierbesitzer und behandelnden Tierärzte verteilt, um anamnestische Daten über Verhaltensänderungen bzw. eine kognitive Dysfunktion der alten Hunde zu erhalten.
3. Im ersten Teil der Arbeit stand die vergleichende Untersuchung verschiedener histochemischer und immunhistologischer Methoden hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität zum Nachweis von Plaques, neurofibrillären Bündeln und einer kongophilen Amyloidangiopathie im Vordergrund. Weiterhin wurde das alters-, geschlechts-, und rasseabhängige Auftreten, die Morphologie und Topografie der im Gehirn immunhistologisch nachweisbaren β A4-Proteinablagerungen beschrieben. Darüber hinaus wurde der Versuch einer Korrelation zwischen klinischen und neuropathologischen Befunden unternommen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das altersabhängige Vorkommen und die Verteilung des Amyloidvorläuferproteins, einer Gliazellaktivierung, einer Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1, -6, -12, TNF- α) und eine mögliche Neuronendegeneration unter Berücksichtigung der Plaquedichte untersucht.

4. Im Methodenvergleich wurde deutlich, daß die Immunhistologie die sensitivste Methode zur Darstellung von Plaques und einer Amyloidangiopathie im Hundehirn ist. Mittels Immunhistologie konnten zwei unterschiedliche Plaquetypen und zwei unterschiedliche laminäre Verteilungsmuster in den oberflächlichen und tiefen Schichten der Großhirnrinde aufgezeigt werden. Die Silberfärbungen wiesen insgesamt geringere Plaquedichten nach, aber zwei der fünf Silberfärbungen (Methode nach Campbell-Switzer und Reusche), die bisher nur für den Menschen beschrieben sind, erbrachten erstaunlich gute und reproduzierbare Ergebnisse beim Hund. Im Gegensatz zum Menschen konnten im Hundehirn keine neurofibrillären Bündel und sogenannte klassische/neuritische Plaques mit einem kongophilen Amyloidkern nachgewiesen werden. Bezüglich der Morphologie ähneln die kaninen Plaques den sogenannten diffusen Plaques des Menschen, die eine hypothetisch initiale Form der Plaqueentstehung darstellen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen den Gefäßablagerungen und den Plaques im Neuropil aufgezeigt werden.
5. Das Auftreten der Plaques und der β A4-Proteinablagerungen in Gefäßen ist ein altersabhängiger Prozeß, der bei Hunden im Alter von acht Jahren beginnt. Interessanterweise stieg die nachweisbare Plaquedichte im Gehirn aber nicht mit zunehmendem Alter der Hunde an. Mittels einer Clusteranalyse konnten drei unterschiedliche Gruppen, d.h. alte Hunde mit einer geringen, mittel- und hochgradigen Anzahl von Plaques, gefunden werden. Hinsichtlich der topografischen Verteilung der Plaques im Hundehirn wurde deutlich, daß sie überwiegend in der Großhirnrinde, in geringerem Ausmaß in Stammhirnregionen und nie in der weißen Substanz des Großhirns und im Kleinhirn lagen. Die Mischlingshunde wiesen häufiger Plaques auf als die Rassehunde, und sie zeigten bezüglich der laminären Verteilung der Plaques öfter das Muster 2 als das Muster 1.
6. Typische altersabhängige Veränderungen im Gehirn der Hunde stellten die Fibrose der Meninx und des Plexus chorioideus, Lipofuszinablagerungen in Neuronen und perivaskulären Makrophagen in grauer und weißer Substanz, perikapilläre Mikroblutungen in der grauen Substanz sowie Sphäroide und sogenannte eosinophile Kügelchen in der weißen Substanz dar. In den immunhistologischen Untersuchungen fand sich eine altersabhängige Zunahme APP-positiver Sphäroide in der weißen Substanz, MHC Klasse II-positiver Mikrogliazellen bzw. BS-1-positiver Zellen in grauer und weißer Substanz, der GFAP-Expression im Zytoplasma von Astrozyten und der TNF- α -Expression in der

- grauen und weißen Substanz sowie dem Hippocampus. Interessanterweise zeigten sich bei einigen der alten Hunde zahlreiche TUNEL-positive Neuronenkerne in den oberflächlichen Kortexschichten, in denen auch Plaques lagen. Möglicherweise liegt beim alten Hund kein Neuronenverlust, sondern eine Neuronendegeneration vor, die sich durch zunehmende DNA-Brüchigkeit, eventuell verbunden mit einem Synapsenverlust und verminderter Neurotransmitterbildung, auszeichnet.
7. Bei alten Hunden, die Plaques aufwiesen, trat eine erhöhte neuronale Amyloidvorläuferprotein-Expression als Folge oder möglicherweise als Ursache der Plaquebildung auf. Weiterhin trat eine zunehmende Anzahl MHC Klasse II-positiver Mikrogliazellen in der weißen Substanz in Verbindung mit einer steigenden Plaquedichte auf. Mit zunehmender Plaquedichte zeigte sich eine erhöhte Interleukin-1-Expression in den Kapillaren der grauen Substanz. In Kolokalisation mit den Plaques in der grauen Substanz fand sich weder eine Mikrogliazellreaktion oder Astrozytose noch eine verstärkte Expression pro-inflammatorischer Zytokine.
 8. In der weißen Substanz des Gehirns alter Hunde traten zahlreiche APP-positive Axonsegmente, aktivierte MHC Klasse II-positive Mikrogliazellen und fibröse Astrozyten in Verbindung mit einer erhöhten TNF- α -Expression insbesondere in der Grenzregion von weißer zu grauer Substanz (Assoziationsfaserbereich) auf, die auf altersabhängige Läsionen in der weißen Substanz des alten Hundes hindeuten. Inwieweit die Befunde in der weißen Substanz an dem klinischen Bild alter Hunde beteiligt sind, ist bisher ungeklärt und gibt Anlaß für weitere Untersuchungen.
 9. Im Gehirn alter Hunde finden sich altersabhängige Veränderungen, wie diffuse Plaques und eine zerebrale Amyloidangiopathie, die den Befunden im Gehirn alter Menschen entsprechen. Für einen neuronalen Ursprung der kaninen Plaques sprechen das laminäre Verteilungsmuster in der Großhirnrinde, das Auftreten morphologisch intakt erscheinender Neuronen in den Plaques und die erhöhte neuronale APP-Expression bei alten Hunden mit Plaques. Die gefäßassoziierten β A4-Proteinablagerungen treten begleitend auf, sind aber wahrscheinlich an der Plaqueentstehung nicht direkt beteiligt. Die Tatsache, daß im Hundegehirn keine plaqueassoziierten Astrozyten- und Mikrogliazellreaktionen in Verbindung mit einer Produktion pro-inflammatorischer Zytokine auftraten, könnte

erklären, weshalb die Plaquekondensation zu klassischen/neuritischen Formen, wie dies für den Menschen beschrieben wird, ausbleibt.

10. Die Korrelation zwischen klinischen und neuropathologischen Befunden erwies sich als sehr schwierig und ist aufgrund des geringen Rücklaufs von Fragebögen nicht abschließend möglich. Einen Hinweis für eine im Gehirn alter Hunde auftretende Neuroendegeneration geben allerdings die TUNEL-positiven Neuronen, obwohl zu berücksichtigen ist, daß das β A4-Protein in Plaques des Hundes nicht in β -Faltblattstruktur, d.h. in einer nicht-neurotoxischen Konformation vorliegt.

7 Summary

1. In the literature section the classification of different amyloid subtypes, amyloidoses and their pathogenic principles are reviewed and a short overview of different detection methods for amyloid depositions in the brain and organs of animals and humans is presented. Furthermore, characteristic neuropathological findings within the aged human brain with special emphasis on Alzheimer's disease are described. Additionally, the age-related neuropathology in the brain of dogs and other animal species is presented.
2. 138 dogs between one month and 18 years of age, collected during 1996-1999, were used in this study. All dogs were submitted for necropsy, brains were fixed in 10% formalin for ten days, cut in 8 transverse sections and embedded in paraffin-wax. For histochemical and most immunohistological studies paraffin-wax embedded sections were used. For immunohistological detection of MHC class II-positive microglial cells frozen tissue sections were employed. Furthermore, a questionnaire was created and distributed to referring veterinarians and pet owners for obtaining anamnestic data about geriatric behavioural changes and age-related cognitive dysfunction.
3. The first part of the study included a comparison of different histochemical (silver stains and Congo red stain) methods and immunohistochemistry with respect to specificity and sensitivity for the detection of plaques, neurofibrillary tangles and cerebral amyloid angiopathy in the canine brain. The age-, sex-, and breed-related occurrence, morphology and spatial distribution of the β A4-protein deposits are described. Furthermore, a correlation between clinical and neuropathological findings was attempted. The second part of the study investigated the age-related occurrence and distribution of the amyloid precursor protein, glial cell activation, pro-inflammatory cytokine expression (IL-1, -6, -12, TNF- α), and the presence of neuronal nuclear fragmentation in correlation to plaque density.
4. Comparison of the different methods showed that immunohistology is by far the most sensitive method for the detection of plaques and cerebral amyloid angiopathy in the canine brain. Immunohistochemically, two different plaque types and two different laminar distribution patterns were detected in superficial and deep cortical layers. The

silver stains revealed a lower plaque density compared to immunohistochemistry and two out of five methods (method of Campbell-Switzer and Reusche), which were until now only described for humans, showed good and reliable staining results in the canine CNS. Canine plaques showed morphologically similarities to human diffuse plaques indicative of an early stage in a hypothetical plaque evolution process. No neurofibrillary tangles and later-stage, Congo red-positive classical/neuritic plaques as described for humans were found in dogs. Immunohistochemistry revealed no association between β A4-protein deposits in vessel walls and plaques in the neuropil.

5. The occurrence of plaques in the neuropil and β A4-protein deposits in meningeal and parenchymal vessels was an age-depending process starting in dogs of eight year of age. Surprisingly, there was no age-depending increase of plaque density. A cluster analysis revealed three different groups of animals, e.g. old dogs with small, moderate and high numbers of plaques in the cortex. Plaques were found predominantly in the neocortex and infrequently in basal brain stem nuclei while the white matter of the cerebrum and the cerebellum were unaffected. Cross-breed dogs had more frequently plaques than pure-breed dogs, and they showed more frequently the distribution pattern 2 than pattern 1.
6. Typical age-related findings in the brains of old dogs were meningeal fibrosis and fibrosis of choroid plexus, lipofuscin accumulation within neurones, lipofuscin-laden perivascular macrophages in gray and white matter, micro-haemorrhages around capillaries in the gray matter and spheroids and so-called eosinophilic bodies in the white matter. Immunohistology revealed an age-related increase of APP-immunopositive axonal spheroids in the white matter, MHC class II-positive microglial cells and BS-1-positive cells in the gray and white matter and strongly GFAP positive hypertrophic astrocytes in the white matter. Furthermore an increased IL-1-expression in meningeal vessels and capillaries of the gray and white matter and an increased TNF- α -expression in the gray and white matter and the hippocampus was found. Interestingly, some old dogs showed numerous TUNEL-positive neuronal nuclei in the superficial cortical layers concurrently with plaques. The latter could be due to increasing DNA-fragility, possible associated with a loss of synapsis and a decreased production of neurotransmitters resulting in neurological deficits.
7. Old dogs with plaques in contrast to old dogs without plaques showed an up-regulation of the amyloid precursor protein in neurons as cause or as a sequela of plaque occurrence.

Surprisingly, the number of MHC class II-positive microglial cells in the white matter correlated to plaque density in the gray matter. Furthermore, in association with growing plaque density an increasing IL-1-expression in capillaries of the white matter was noted. In the gray matter activated microglial cells, astrocytes and pro-inflammatory cytokines were not associated with plaques.

8. In the white matter of the cerebrum of old dogs numerous APP-positive axonal spheroids, activated MHC class II-positive microglial cells and prominent fibrous astrocytes in combination with an increased TNF- α -expression especially at the junction between white and gray matter were found. The latter might present the morphology of a distinct white matter disease in old dogs.
9. Old dogs developed age-related changes including plaques and cerebral amyloid angiopathy similar to aged human brains. The laminar distribution pattern of the plaques in the brain, the association of plaques with apparently morphologically normal neurons and the increase of neuronal APP-expression indicates a possible neuronal origin of the plaques in dogs. β A4-protein deposits in vessel walls represent a concomitant finding in the canine brain, which does not contribute to formation of plaques. The lack of plaque-associated microglial cell activation, astrogliosis, and no detectable pro-inflammatory cytokine expression might explain, why plaque condensation or progression from early-stage diffuse to late-stage classical/neuritic plaques in the dog brain does not occur. The present study revealed numerous age-related changes in the brain of aged dogs, however, only few findings were related to the number of plaques. Though cluster analysis indicated the existence of a subgroup of aged dogs with a high plaque density, an interpretation of this finding is still inconclusive.
10. A correlation between clinical findings and neuropathological results based on the few returned anamnestic questionnaires was not possible and remains speculative. However, there might be neuronal degeneration in old dogs as shown by the increased number of TUNEL-positive neurons in the cortical layers with plaques, although the canine β A4-protein has not a β -pleated sheet conformation and therefore lacks a neurotoxic structure.

8 Literaturverzeichnis

- Adams, I. (1987).** Plasticity of the synaptic contact zone following loss of synapses in the cerebral cortex of aging humans. *Brain Res* 424: 343-351
- Aisen, P. S. (1995).** Inflammation and Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 28: 83-87
- Alldinger, S., Wünschmann, A., Baumgärtner, W., Voss, C., Kremmer, E. (1996).** Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. *Acta Neuropathol* 92: 273-280
- Alzheimer, A. (1906).** Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Zentralbl Nervenheilk Psychiat* 18: 177-179
- Anderson, J. M., Hubbard, B. M., Coghill, G. R., Slidders, W. (1983).** The effect of advanced old age on the neuron content of the cerebral cortex. *J Neuro Sci* 58: 233-244
- Arnold, S. E., Heyman, B. T., Flory, J., Damasio, A. R., Van Hoesen, G. W. (1991).** The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1: 103-116
- Arriagada, P. V., Marzloff, K., Hyman, B. T. (1992).** Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* 42: 1681-1688
- Bachevalier, J., Landis, S. L., Walker, L. C., Brickson, M., Mishkin, M., Price, D. L., Cork, L. C. (1991).** Aged monkeys exhibit behavioral deficits indicative of widespread cerebral dysfunction. *Neurobiol Aging* 12: 99-111
- Backstrom, J. R., Lim, G. P., Cullen, M. J., Tokes, Z. A. (1996).** Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci* 16: 7910-7919
- Ball, M. J., Mc Gregor, J., Fyfe, I. M., Rapoport, S. I., London, E. D. (1983).** Paucity of morphological changes in the brains of ageing beagle dogs: further evidence that Alzheimer lesions are unique for primate central nervous system. *Neurobiol Aging* 4: 127-131
- Banati, R. B., Graeber, M. B. (1994).** Surveillance, intervention and cytotoxicity: Is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci* 16: 114-127
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Wisniewski, H. M. (1989).** Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 477: 90-99

- Barron, S. A., Jacobs, L., Kinkel, W. R. (1976).** Changes of size of normal lateral ventricles during ageing determined by computerized tomography. *Neurology* 26: 1011-1013
- Beach, T. G., Walker, R., Mc Geer, E. G. (1989).** Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia* 2: 420-436
- Behl, C. (1997).** Amyloid β -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res* 290: 471-480
- Beljahow, S. (1889).** Pathological changes in the brain in dementia senilis. *J Ment Sci* 35: 261-262
- Benedikz, E., Merz, G. S., Schwenk, V., Johansen, T E., Wisniewski, H. M., Rushbrook, J. I. (1999).** Cellular processing of the amyloidogenic cystatin C variant of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type. *Amyloid* 6: 172-182
- Beyreuther, K., Masters, C. L. (1991).** Amyloid precursor protein (APP) and β A4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease: precursor-product relationships in the derangement of neuronal dysfunction. *Brain Pathol* 1: 241-251
- Bierer, L. M., Hof, P. R., Purohit, D. R., Carlin, L., Schmeidler, J., Davis, K.L., Perl, D. P. (1995).** Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52: 81-88
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stockin, K. L., Reddy, P., Stinivasan, S., Nelson, N., Boianin, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. (1997).** A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385: 729-733
- Bons, N., Mestre, N., Petter, A. (1992).** Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate, *Microcebus murinus*. *Neurobiol Aging* 13: 99-105
- Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C. F., Pepys, M. B. (1997).** Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* 385: 787-793
- Borras, D., Ferrer, I., Pumarola, M. (1999).** Age-related changes in the brain of the dog. *Vet Pathol* 36: 202-211
- Borras, D., Pumarola, M., Ferrer, I. (2000).** Neuronal nuclear DNA fragmentation in the aged canine brain: apoptosis or nuclear DNA fragility? *Acta Neuropathol* 99: 402-408
- Boyce, J. T., Di Bartola, S. P., Chew, D. J., Gasper, P. W. (1984).** Familial renal amyloidosis in Abyssinian cats. *Vet Pathol* 21: 33-38

- Braak, H., Braak, E., Grundke-Iqbal I. (1986).** Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: A third localization of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 65: 351-355
- Braak, H., Braak, E. (1991a).** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259
- Braak, H., Braak, E. (1991b).** Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1: 213-216
- Braak, H., Braak, E., Strothjohann, M. (1994).** Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neurosci Lett* 171: 1-4
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J., Reintjes, R. (1996a).** Age, neurofibrillary changes, A β -amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 210: 87-90
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., De Vos, R. A. I., Jansen, E. N. H., Bohl, J. (1996b).** Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Trans* 103: 455-490
- Brody, H. (1960).** The deposition of aging pigment in the human cerebral cortex. *J Gerontol* 15: 258-261
- Brody, H. (1992).** The aging brain. *Acta Neurol Scand* 137: 40-44
- Bronson, R. T., Lipman, R. D., Harrison, D. E. (1993).** Age-related gliosis in the white matter of mice. *Brain Res* 609: 124-128
- Brown, D. R., Herms, J. W., Schmidt, B., Kretzschmar, H. A. (1997).** PrP and β -amyloid fragments activate different neurotoxic mechanisms in cultured mouse cells. *Eur J Neurosci* 9: 1162-1169
- Brugge, K. L., Nichols, S. L., Salmon, D. P., Hill, L. R., Delis, D. C., Aaron, L., Trauner, D. A. (1994).** Cognitive impairment in adults with Down's syndrome: similarities to early cognitive changes in Alzheimer's disease. *Neurology* 44: 232-238
- Brun, A., Englund, E. (1981).** Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading. *Histopathol* 5: 549-564
- Burger, P. C., Vogel, V. S. (1973).** The development of the pathological changes of Alzheimer's disease and senile dementia in patients with Down's syndrome. *Am J Pathol* 73: 457-476
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Ceretti, D. P., Black, R. A. (1998).** Evidence that tumor

necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273: 27765-27767

Cai, X., Golde, T. E., Younkin, S. G. (1993). Release of excess amyloid β protein from mutant amyloid β protein precursor. *Science* 259: 514-516

Calvo, J. L., Carbonell, A. L., Boya, J. (1991). Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res* 566: 333-336

Campbell, S. K., Switzer, R. C., Martin, T. L. (1987). Alzheimer's plaques and tangles: A controlled and enhanced silver staining method. *Soc Neurosci Abstr* 13: 678

Campistol, J. M., Argiles, A. (1996). Dialysis-related amyloidosis: visceral involvement and protein constituents. *Nephrol Dial Transplant* 11: 142-145

Carvalho, K. M., Franca, M. S., Camarao, G. C., Ruchon, A. F. (1997). A new brain metalloendopeptidase which degrades the Alzheimer beta-amyloid 1-40 peptide producing soluble fragments without neurotoxic effects. *Braz J Med Biol Res* 30: 1153-1156

Castano, E. M., Frangione, B. (1991). Alzheimer's disease from the perspective of the systemic and localized forms of amyloidosis. *Brain Pathol* 1: 263-271

Cheville, N. F., Cutlip, R. C., Moon, H. W. (1970). Microscopic pathology of the gray collie syndrome. *Vet Pathol* 7: 225-245

Chen, K. S., Masliah, E., Grajeda, H., Guido, T., Huang, J., Khan, K., Motter, R., Soriano, F., Games, D. (1998). Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V-F transgenic mice. *Prog Brain Res* 117: 327-334

Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., Mc Conlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Selkoe, D. J. (1992). Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* 360: 672-674

Clinton, J., Roberts, G. W., Gentleman, S. M., Royston, M. C. (1993). Differential pattern of beta-amyloid protein deposition within cortical sulci and gyri in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19: 277-281

Coelho, T. (1996). Familial amyloid polyneuropathy: new developments in genetics and treatment. *Curr Opin Neurol* 9: 355-359

Cohen, A. S., Connors, L. H. (1987). The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis. *J Pathol* 151: 1-10

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of

apolipoprotein II type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923

Coria, F., Castano, E. M., Frangione, B. (1987). Brain amyloid in normal aging and cerebral amyloid angiopathy is antigenically related to Alzheimer's disease beta-protein. *Am J Pathol* 129: 422-428

Coria, F., Moreno, A., Torres, A., Ahmad, I., Ghiso, J. (1992). Distribution of Alzheimer's disease amyloid protein precursor in normal human and rat nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18: 27-35

Cork, L. C., Kitt, C. A., Strubel, R. G., Griffin, J. W., Price, D. L. (1987). Animal models of degenerative neurological disease. *Prog Clin Biol Res* 229: 241-269

Cork, L. C., Powers, R. E., Selkoe, D. J., Davies, P., Geyer, J. J., Price, D. L. (1988). Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears. *J Neuropathol Exp Neurol* 47: 629-641

Cork, L. C., Masters, C., Beyreuther, K., Price, D. L. (1990). Development of senile plaques. Relationships of neuronal abnormalities and amyloid deposits. *Am J Pathol* 137: 1383-1391

Cragg, B. G. (1975). The density of synapses in neurons in normal, mentally defective and aging human brains. *Brain* 98: 81-90

Cruts, M., Hendriks, L., Van Broeckhoven, C. (1996). The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology. *Hum Mol Gen* 5: 1449-1455

Cummings, B. J., Su, J., Cotman, C., White, R., Russel, M. (1993). β -amyloid accumulation in the aged canine brain: A model of early plaque formation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 14: 547-560

Cummings, B. J., Cotman, C. W. (1995). Image analysis of β -amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity. *Lancet* 346: 1524-1528

Cummings, B. J., Head, E., Afagh, A. (1996a). β -amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. *Neurobiol Learn Mem* 66: 11-23

Cummings, B. J., Head, E., Ruehl, W., Milgram, N. W., Cotman, C. W. (1996b). The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging* 17: 259-268

Cummings, B. J., Pike, C. J., Shankle, R., Cotman, C. W. (1996c). β -amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17: 921-933

Cummings, B. J., Satou, T., Head, E., Milgram, N. W., Cole, G. M., Savage, M. J., Podlisny, M. B., Selkoe, D. J., Siman, R., Greenberg, B. D., Cotman, C. W. (1996d).

Diffuse plaques contain C-terminal A beta 42 and not A beta 40: evidence from cats and dogs. *Neurobiol Aging* 17: 653-659

Dahme, E. (1962). Pathologische Befunde an den Gehirngefäßen bei Tieren: Die Veränderungen der Hirngefäße beim alten Hund. *Acta Neuropathol* 1: 54-60

Dahme, E., Sprengler, B. (1976). Weitere Überlegungen zur Pathogenese des Altersamyloids in Meninx- und Hirnrindenarterien beim Hund. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 89: 64-47

Dahme, E., Schröder, B. (1979). Kongophile Angiopathie, cerebrovasculäre Mikroaneurysmen und cerebrale Blutungen beim alten Hund. *Zbl Vet Med* 26: 601-613

Dahme, E. (1994). Stroke in dogs. *Tierärztl Prax* 22: 112-114

Dale, G. E., Leigh, P. N., Luthert, P., Anderton, B. H., Roberts, G. W. (1991). Neurofibrillary tangles in dementia pugilistica are ubiquitinated. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 54: 116-118

Dal Forno, G., Rasmusson, X., Brandt, J., Carson, K. A., Brookmeyer, R., Troncos, J., Kawas, C. H. (1996). Apolipoprotein genotype and rate of decline in probable Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 53: 345-350

Danckert, D., Kraft, W. (1997). Alters- und Rassenverteilungen einer Hundepopulation. *Kleintierpraxis* 42: 77-168

Dayan, A. D. (1970). Quantitative histological studies on the aged human brain. 1. Senile plaques and neurofibrillary tangles in "normal" patients. *Acta Neuropathol* 16: 85-94

Deichsel, G. und Trampisch, H. J. (1985). Clusteranalyse und Diskriminanzanalyse. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

Del Rio-Hortega, P. (1919). El tercer elemento de los centro nerviosos. *Boll Soc Espanol Biol* 9: 68-120

De la Fourniere-Bessueille, L., Grange, D., Buchet, R. (1997). Purification and spectroscopic characterization of beta-amyloid precursor protein from porcine brains. *Eur J Biochem* 250: 705-711

De Strooper, B., Saftig, S., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391: 387-390

Dekaban, A. S., Sadowsky D. (1978). Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann Neurol* 4: 345-356

- De Witt, D. A., Perry, G., Cohen, M., Doller, C., Silver, J. (1998).** Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 149: 329-340
- Di Bartola, S. P., Tarr, M. J., Webb, D. M., Giger, U. (1990).** Familial renal amyloidosis in Chinese Shar Pei dogs. *J Am Vet Med Assoc* 197: 483-487
- Dickson, D. W., Koziek-Reding, H., Davies, P., Yen, S. H. (1987).** A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope in Alzheimer neurofibrillary tangles neurofilaments and tau proteins immunostains granulo-vacuolar degeneration. *Acta Neuropathol* 73: 254-258
- Dickson, D. W., Wetkin, A., Kress, Y. (1990).** Ubiquitin immunoreactive structures in normal human brains: distribution and developmental aspects. *Lab Invest* 63: 87-99
- Dickson, D. W., Mattiace, L. A., Kure, K., Hutchins, K., Lyman, W. D., Brosnan, C. F. (1991).** Microglia in human disease, with an emphasis on acquired immune deficiency syndrome. *Lab Invest* 64: 135-151
- Dickson, D. W., Crystal, H. A., Mattiace, L. A., Masur, D. M., Blau, A D., Davies, P., Yen, S. H., Aronson, M. K. (1992).** Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 13: 179-189
- Discroll, J. (1994).** The role of the proteasome in cellular protein degradation. *Histol Histopathol* 9: 197-202
- Dixon, W. J. (1993).** BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
- Doi-Yi, R., Kitamoto, T., Tateishi, J. (1991).** Immunoreactivity of cerebral amyloidosis is enhanced by protein denaturation treatments. *Acta Neuropathol* 82: 260-265
- Dormont, D. (1998).** Biology of non-conventional transmissible agents or prions. *Rev Neurol* 154: 142-151
- Egensperger, R., Kosel, S., Von Eitzen, U., Graeber, M. B. (1998).** Microglial activation in Alzheimer disease: Association with APOE genotype. *Brain Pathol* 8: 439-447
- Eikelenboom, P., Veerhuis, R. (1996).** The role of complement and activated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17: 673-680
- Eisensmith, S. P. (1993).** PlotIT-Graphics & Statistics. Scientific Programming Enterprises, Haslett, MI 48840, USA
- El Khoury, J., Hickman, S. E., Thomas, C. A., Cao, L., Silverstein, S. C., Loike, J. D. (1996).** Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to β -amyloid fibrils. *Nature* 382: 716-719
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S. (1994).** GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathol* 4: 229-237

- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., Ward, P. J. (1990).** Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248: 1122-1124
- Esiri, M. M., Wilcock, G. K. (1986).** Cerebral amyloid angiopathy in dementia and old age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49: 1221-1226
- Fankhauser, R., Luginbühl, H. (1968).** Zentrales Nervensystem. In: E. Joest: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 3. Aufl., 3: 191-436, Parey, Berlin-Hamburg
- Ferreira, A., Caceres, A., Kosik, K. S. (1993).** Intraneuronal compartments of the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 13: 3112-3123
- Ferrer, I., Pumarola, M., Rivera, R., Zujar, M. J., Cruz-Sanchez, F., Vidal, A. (1993).** Primary white matter degeneration in old dogs. *Acta Neuropathol* 86: 172-175
- Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., Salmona, M. (1996).** Apoptosis-mediated neurotoxicity induced by β -amyloid and PRP fragments. *Mol Chem Neuropathol* 28: 163-171
- Frackowiak, J., Mazur-Kolecka, B., Wisniewski, H. M., Potempska, A., Carroll, R. T., Emmerling, M. R., Kim, K. S. (1995).** Secretion and accumulation of Alzheimer's beta-protein by cultured vascular smooth muscle cells from old and young dogs. *Brain Res* 676: 225-230
- Francis, P. T., Webster, M. T., Chessel, I. P., Holmes, C., Stratmann, G. C., Procter, A. W., Cross, A. J., Green, A. R., Bowen, D. M. (1993).** Neurotransmitters and second messengers in aging and Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 695: 19-26
- Fukumoto, H., Asami-Odaka, A., Suzuki, N., Iwatsubo, T. (1996).** Association of A β 40-positive senile plaques with microglial cells in the brains of patients with Alzheimer's disease and in non-demented aged individuals. *Neurodegeneration* 5: 13-17
- Funato, H., Yoshimura, M., Yamazaki, T., Saido, T. C., Ito, Y., Yokofujita, J., Okeda, R., Ihara, Y. (1998).** Astrocytes containing amyloid beta-protein (A β)-positive granules are associated with A β 40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *Am J Pathol* 152: 983-992
- Furukawa, K., Abe, Y., Akaike, N. (1994).** Amyloid beta protein-induced irreversible current in rat cortical neurones. *Neuroreport* 5: 2016-1018
- Galloway, P. G., Perry, G., Gambetti, P. (1987).** Hirano body filaments contain actin and associated proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 46: 185-199
- Gallyas, F. (1971).** Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morph Acad Sci Hung* 19: 1-8

- Gallyas, F. (1980).** Chemical nature of the first products (nuclei) of the argyrophil staining. *Acta Histochem* 67: 145-158
- Gallyas, F. (1982a).** Physico-chemical mechanism of the argyrophil I reaction. *Histochem* 74: 393-407.
- Gallyas, F. (1982b).** Physico-chemical mechanism of the argyrophil III reaction. *Histochem* 74: 409-421
- Gearing, M., Rebeck, G. W., Hyman, B. T., Tigges, J., Mirra, S. S. (1994).** Neuropathology and apolipoprotein E profile of aged chimpanzees: implications for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9382-9386
- Gearing, M., Tigges, J., Mori, H., Mirra, S. S. (1997).** Beta-amyloid (A beta) deposition in the brains of aged orang-utans. *Neurobiol Aging* 18: 139-146
- Geisel, O., Linke, R. P. (1997).** Das Wichtigste zu Diagnostik und Therapie der Amyloidosen bei Tieren. *Tierärztl Umschau* 52: 655-658
- Gentleman, S. M., Nash, M. J., Sweeting, C. J., Graham, D. I., Roberts, G. W. (1993).** Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 160: 139-144
- Giaccone, G., Verga, L., Finazzi, M., Pollo, B., Tagliavini, F., Frangione, B., Bugiani, O. (1990).** Cerebral preamyloid deposits and congophilic angiopathy in dogs. *Neurosci Lett* 114: 178-183
- Gibson, P., Tomlinson, B. E. (1977).** The number of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented subjects with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 33: 199-206
- Giulian, D. (1999).** Microglia and the immune pathology of Alzheimer's disease. *Am J Hum Genet* 65: 13-18
- Glenner, G. G. (1980).** Amyloid deposits and amyloidosis. *N Engl J Med* 302: 1283-1290
- Glenner, G. G., Henry, J. H., Fujihara, S. (1981).** Congophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's degeneration. *Ann Pathol* 1: 120-129
- Glenner, G. G., Wong, C. W. (1984a).** Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 885-890
- Glenner, G. G., Wong, C. W. (1984b).** Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1131-1135
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Crowther, R. A. (1991).** Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol* 1: 279-286

- Goldman, J. E., Yen, S. (1986).** Cytoskeletal protein abnormalities in neurodegenerative disease. *Ann Neurol* 19: 209-223
- Granville, D. J., Carthy, C. M., Hunt, D. W. C., McManus, B. M. (1998).** Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 78: 893-913
- Graves, A. B., White, E., Koepsell, T. D., Reifler, B. V., Van Belle, G., Larson, E. B., Raskind, M. (1990).** The association between head trauma and Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol* 131: 491-501
- Griffin, W. S. T., Sheng, J. G., Gentleman, S. M., Graham, D. I., Mrak, R. E., Roberts, G. W. (1994).** Microglial interleukin-1 α expression in human head injury: correlations with neuronal and neuritic β -amyloid precursor protein expression. *Neurosci Lett* 176: 133-136
- Griffin, W. S. T., Sheng, J. G., Roberts, G. W., Mrak, R. E. (1995).** Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 276-281
- Griffin, W. S. T., Sheng, J. G., Royston, M. C., Gentleman, S. M., Mc Kenzie, J. E., Graham, M. D., Roberts, G. W., Mrak, R. E. (1998).** Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a "cytokine cycle" in disease progression. *Brain Pathol* 8: 65-72
- Gröne, A., Alldinger, S., Baumgärtner, W. (2000).** Interleukin-1 β , -6, -12 and tumor necrosis factor- α expression in brains of dogs with canine distemper virus infection. *J Neuroimmunol* 110: 20-30
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, J., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., Selkoe, D. J. (1992).** Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359: 322-325
- Haga, S., Akai, K., Ishii, T. (1989).** Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. An immunohistochemical study using a novel monoclonal antibody. *Acta Neuropathol* 77: 569-575
- Hainfeller, J. A., Wanschitz, J., Jellinger, K., Liberski, P. P., Gulotta, F., Budka, H. (1998).** Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 96: 116-122
- Hamir, A. N., Sullivan, N. D., Handson, P. D. (1984).** Neuropathological lesions in experimental lead toxicosis of dogs. *J Comp Pathol* 94: 215-231

- Härtig, W., Brückner, G., Schmidt, C., Brauer, K., Bodewitz, G., Turner, J. D., Bigl, V. (1997).** Co-localisation of β -amyloid peptides, apolipoprotein E and glial markers in senile plaques in the prefrontal cortex of old rhesus monkeys. *Brain Res* 751: 315-322
- Hartmann, T., Bieger, S. C., Brühl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, K., Beyreuther, K. (1997).** Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A β 40/42 amyloid peptides. *Nature Med* 3: 1016-1023
- Hartsough, G. R., Burger, D. (1965).** Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* 115: 387-392
- Head, E., Milgram, N. W. (1992).** Changes in spontaneous behavior in the dog following oral administration of L-deprenyl. *Pharmacol Biochem Behav* 43: 749-757
- Head, E., Mehta, R., Hartley, J., Kameka, M., Cummings, B. J., Cotman, C., Reid, C., Milgram, N. (1995).** Spatial learning and memory as a function of age in the dog. *Behav Neurosci* 109: 851-858
- Head, E., Hartley, J., Kameka, A. M., Mehta, R., Ivy, G. O., Ruehl, W. W., Milgram, N. W. (1996).** The effects of L-deprenyl on spatial short term memory in young and aged dogs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* 20: 515-530
- Head, E., Callahan, H., Cummings, B. J., Cotman, C. W., Ruehl, W. W., Muggenburg, B. A., Milgram, N. W. (1997).** Open field activity and human interaction as a function of age and breed in dogs. *Physiol Behav* 62: 963-971
- Head, E., Callahan, H., Muggenburg, B. A., Cotman, C. W., Milgram, N. W. (1998).** Visual-discrimination learning ability and beta-amyloid accumulation in the dog. *Neurobiol Aging* 19: 415-525
- Head, E., McCleary, R., Hahn, F. F., Milgram, N. W., Cotman, C. W. (2000).** Region-specific age at onset of β -amyloid in dogs. *Neurobiol Aging* 21: 89-96
- Henderson, A. S., Easteal, S., Jorm, A. F., Mackinnon, A. J., Korten, A. E., Christensen, H., Croft, L., Jacomb, P. A. (1995).** Apolipoprotein E allele ϵ 4, dementia and cognitive decline in a population sample. *Lancet* 346: 1387-1390
- Hendriks, L., van Broeckhoven, C. (1996).** The β A4 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease. *Eur J Biochem* 237: 6-15
- Hirano, A., Malamud, N., Elizan, T. S., Kurland, L. T. (1966).** Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia complex of Guam. *Arch Neurol* 15: 35-51
- Hirano, A., Dembitzer, H. M., Kurland, L. D., Zimmermann, H. M. (1968).** The fine structure of some intraganglionic alterations. *J Neuropathol Exp Neurol* 27: 167-182

- Hou, Y., White, R. G., Bobik, M., Marks, J. S., Russel, M. J. (1997).** Distribution of beta-amyloid in the canine brain. *Neuroreport* 8: 1009-1012
- Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H. (1981).** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580
- Hubbard, B. N., Anderson J. M. (1981a).** Age, senile dementia and ventricular enlargement. *J Neurol Neurosurg* 44: 631-635
- Hubbard, B. N., Anderson, J. M. (1981b).** A quantitative study of cerebral atrophy in old age and senile dementia. *J Neurol Sci* 50: 135-140
- Hüll, M., Strauss, S., Volk, B., Berger, M., Bauer, J. (1995).** Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to the brains of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol* 89: 544-551
- Hüll, M., Strauss, S., Berger, M., Volk, B., Bauer, J. (1996).** The participation of interleukin-6, a stress-inducible cytokine, in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 78: 37-41
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R., Barnes, C. L. (1984).** Cell specific pathology isolates the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Science* 225: 1168-1170
- Hyman, B. T., Van Hoesen G. W., Kromer, L. J., Damasio, A. R. (1986).** Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 20: 473-482
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R. (1987).** Alzheimer's disease: Glutamate depletion in perforant pathway terminals. *Ann Neurol* 22: 37-40
- Hyman, B. T., Van Hoesen G. W., Damasio A. R. (1990).** Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: An anatomical study. *Neurology* 40: 1721-1730
- Ikeda, S., Wong, C. W., Allsop, D., Landon, M., Kidd, M., Glenner, G. (1987).** Immunolabelling of cerebrovascular and neuritic plaque amyloid fibrils in Alzheimer's disease with an anti- β protein monoclonal antibody. *Lab Invest* 57: 446-449
- Ishihara, T., Gondo, T., Takahashi, M., Uchino, F., Ikeda, S., Allsop, D., Imai, K. (1991).** Immunohistochemical and immunoelectron microscopical characterization of cerebrovascular and senile plaque amyloid in aged dogs' brains. *Brain Res* 548: 196-205
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., Ihara, Y. (1994).** Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42 (43). *Neuron* 13: 45-53

- Jakob, W. (1970).** Untersuchungen über die Altersamyloidose der Katze. Zentralbl Veterinärmed A 17: 261-272
- Jamada, M. (1968).** Distribution of senile changes in the brain. The part of the limbic system in Alzheimer's disease and senile dementia. Arch Psychiatr Nervenkr 221: 308-324
- Jarret, J. T., Berger, E. P., Lansbury, P. T. (1993).** The carboxy terminus of the beta-amyloid protein is critical for seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Biochemistry 32: 4693-4697
- Johnson, K. H., O'Brien, T. D., Betsholtz, C., Westermark, P. (1992a).** Islet amyloid polypeptide: Mechanisms of amyloidogenesis in the pancreatic islets and potential roles in diabetes mellitus. Lab Invest 66: 522-535
- Johnson, K. H., Sletten, K., Hayden, D. W., O'Brien, T. D., Roertgen, K. E., Westermark, P. (1992b).** Pulmonary vascular amyloidosis in aged dogs. A new form of spontaneously occurring amyloidosis derived from apolipoprotein AI. Am J Pathol 141: 1013-1019
- Johnstone, E. M., Chaney, M. O., Norris, F. H., Pascual, R., Little, S. P. (1991).** Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. Mol Brain Res 10: 299-305
- Kalaria, R. N. (1993a).** The immunopathology of Alzheimer's disease and some related disorders. Brain Pathol 3: 333-347
- Kalaria, R. N., Bhatti, S. U., Palatinsky, E. A., Pennington, D. H., Shelton, E. R., Chan, H. W., Perry, G., Lust, W. D. (1993b).** Accumulation of the beta amyloid precursor protein at sites of ischemic injury in rat brain. Neuroreport 4: 211-214
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Master, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B. (1987).** The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325: 733-736
- Kastner, D. L. (1998).** Familial Mediterranean fever: the genetics of inflammation. Hosp Pract 33: 131-134
- Kelly, J. F., Furukawa, K., Barger, S. W., Rengen, M. R., Mark, R. J., Blanc, E. M., Rozh, G. S., Mattson, M. P. (1996).** Amyloid β -peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. Proc Natl Acad Sci 93: 6753-6758
- Kelly, J. W. (1997).** Amyloid fibril formation and prion misassembly: a structural quest for insights into amyloid and prion disease. Structure 5:595-600

- Kawarabayashi, T., Shoji, M., Yamaguchi, H., Tanaka, M., Harigaya, Y., Ishiguro, K., Shunsaku, H. (1993).** Amyloid β protein precursor accumulates in swollen neurites throughout rat brain with aging. *Neurosci Lett* 153: 73-76
- Khachaturian, Z. S. (1985).** Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 42: 1097-1105
- Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Nakamura, S., Doi, K. (1998).** Lectin histochemistry in the aged dog brain. *Acta Neuropathol* 95: 261-268
- Kiatipattanasakul, W., Nakamura, S., Hossain, M. M., Nakayama, H., Uchino, T., Shumiya, S., Goto, N., Doi, K. (1996).** Apoptosis in the aged dog brain. *Acta Neuropathol* 92: 242-248
- Kidd, M. (1964).** Alzheimer's disease: an electron microscopic study. *Brain* 87: 307-320
- Kim, K. S., Wegiel, J., Sapienza, V., Chen, J., Hong, H., Wisniewski, H. M. (1997).** Immunoreactivity of presenilin-1 in human, rat and mouse brain. *Brain Res* 757: 159-163
- Kirkwood, J. K., Cunningham, A. A. (1994).** Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet Rec* 135: 296-303
- Kisilevsky, R., Fraser, P. E. (1997).** A beta amyloidosis: unique, or variation on a systemic theme? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32: 361-404
- Kita, T., Tanaka, T., Tanaka, N., Kinoshita, Y. (2000).** The role of tumor necrosis factor- α in diffuse axonal injury following fluid-percussive brain injury in rats. *Int J Legal Med* 113: 221-228
- Kitamoto, T., Ogomori, K., Tateishi, J., Prusiner, S. B. (1987).** Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab Invest* 57: 230-236
- Kjeldsberg, C. R., Eyre, H. J., Totzke, H. (1977).** Evidence for intracellular amyloid formation in myeloma. *Blood* 50: 493-504
- Kondoh, H., Matsushita, M., Kosaka, K., Miyazaki, N. (1993).** Staining senile plaques using Bodian's method modified with methenamine. *Biotech Histochem* 68: 113-116
- Koo, E. H., Squazzo, S. (1994).** Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269: 17386-17389
- Kraft, W. (1997).** Wann werden Hund und Katze „alt“? *Tierärztl Prax* 25: 536-539
- Lafora, G. R. (1914).** Neoformaciones dendriticas en las neuronas y alteraciones de la neuroglia en el perro senil. *Lab de Investig Biol* 39-53
- Langui, D., Probst, A., Ulrich, J. (1995).** Alzheimer's changes in non-demented and demented patients: a statistical approach to their relationships. *Acta Neuropathol* 89: 57-62
- Larner, A. J. (1997).** The cerebellum in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 8: 203-209

- Lee, E. J., Hung, Y. C., Lee, M. Y. (1999).** Anemic hypoxia in moderate intracerebral hemorrhage: the alterations of cerebral hemodynamics and brain metabolism. *J Neurol Sci* 164: 117-132
- Lemere, C. A., Lopera, F., Kosik, K. S., Lendon, C. L., Ossa, J., Saido, T. C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapie, L., Arango, J. C., Anthony, D. C., Koo, E. H., Goate, A. M., Selkoe, D. J., Arango, J. C. (1996).** The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* 2: 1146-1150
- Lendon, L. C., Ashall, F., Goate, A. M. (1997).** Exploring the etiology of Alzheimer's disease using molecular genetics. *J Am Med Assoc* 277: 825-831
- Levy-Lahad, E., Bird, T. D. (1996).** Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. *Ann Neurol* 40: 829-840
- Levy, E., Amorim, A., Frangione, B., Walker, L. C. (1995).** Beta-amyloid precursor protein gene in squirrel monkeys with cerebral amyloid angiopathy. *Neurobiol Aging* 16: 805-808
- Li, W. P., Chan, W. Y., Lai, H. W. L., Yew, D. T. (1997).** Terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) positive cells in the different regions of the brain in normal aging and Alzheimer patients. *J Mol Neurosci* 8: 75-82
- Li, Q., Whyte, S., Tanner, J. E., Evin, G., Beyreuther, K., Masters, C. L. (1998).** Secretion of Alzheimer's disease A β amyloid peptide by activated human platelets. *Lab Invest* 78: 461-469
- Lin, B., Schmidt-Kastner, R., Busto, R., Ginsberg, M. (1999).** Progressive parenchymal deposition of β -amyloid precursor protein in rat brain following global cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 97: 359-368
- Linke, R. P., Trautwein, G. (1989).** Immunoglobulin lambda-light-chain-derived amyloidosis (A lambda) in two horses. *Blut* 58: 129-132
- Linke, R. P., Geisel, O., Mann, K. (1991).** Equine cutaneous amyloidosis derived from an immunoglobulin lambda-light chain. Immunohistochemical, immunochemical and chemical results. *Biol Chem Hoppe Seyler* 372: 835-843
- Ling, E., Wong, W. (1993).** The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7: 9-18
- Lorenzo, A., Yanker, B. A. (1994).** Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci* 91: 12243-12247
- Loffler, J., Huber, G. (1992).** Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development. *J Neurochem* 59: 1316-1324

- Lowe, J., Blanchard, A., Morrell, K., Lennox, G., Reynolds, L., Billett, M., Landon, M., Mayer, R J. (1988).** Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and Mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol* 155: 9-15
- Lutz, T. A., Rand, J. S. (1995).** Pathogenesis of feline diabetes mellitus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 25: 527-552
- Ma, J., Yee, A., Brewer, H. B., Das, S., Potter, H. (1994).** Amyloid-associated proteins α_1 -antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer β -protein into filaments. *Nature* 372: 92-94
- Maat-Schiemann, M. L., Yamaguchi, H., Van Duinen, S. G., Natta, R., Roos, R. A. (2000).** Age-related plaque morphology and C-terminal heterogeneity of amyloid beta in Dutch-type hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Acta Neuropathol* 99: 409-419
- Mackic, J. B., Weiss, M. H., Miao, W., Kirkman, E., Ghiso, J., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Zlokovic, B. V. (1998).** Cerebrovascular accumulation and increased blood-brain barrier permeability to circulating Alzheimer's amyloid beta peptide in aged squirrel monkey with cerebral amyloid angiopathy. *J Neurochem* 70: 210-215
- Maldonado, T. A., Jones, R. E., Norris, D. O. (2000).** Distribution of beta-amyloid and amyloid precursor protein in the brain of spawning (senescent) salmon: a natural, brain-aging model. *Brain Res* 858: 237-251
- Mancardi, G. L., Liwnicz, B. H., Mandybur, T. I. (1983).** Fibrous astrocytes in Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer type. *Acta Neuropathol* 61: 76-90
- Mandybur, T. I. (1986).** Cerebral amyloid angiopathy: the vascular pathology and complications. *J Neuropathol Exp Neurol* 45: 79-90
- Mandybur, T. I., Chuirazzi, B. A. (1990).** Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. *Neurology* 40: 635-639
- Mann, D. M. A., Brown, A., Prinja, D., Davies, C. A., Landon, M., Masters, C. L., Beyreuther, K. (1989).** An analysis of the morphology of senile plaques in Down's syndrome patients of different ages using immunocytochemical and lectin histochemical methods. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15: 317-329
- Mann, D. M. A., Yate, P. O. (1974).** Lipoprotein pigments. Their relationship to ageing in the human central nervous system. *Brain* 97: 489-498
- Mann, D. M. A., Yates, P. O., Stamp, J. E. (1978).** The relationship between lipofuscin pigment and ageing in the human nervous system. *J Neurol Sci* 37: 83-93

- Markesbery, W. R., Carney, J. M. (1999).** Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9: 133-146
- Martin, L. J., Sisodia, S. S., Koo, E. H., Cork, L. C., Dellovade, T. L., Weidemann, A., Beyreuther, K., Masters, C., Price, D. L. (1991).** Amyloid precursor protein in aged nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci* 88: 1461-1465
- Martin, L. J., Pardo, C. A., Cork, L. C., Price, D. L. (1994).** Synaptic pathology and glial responses to neuronal injury precede the formation of senile plaques and amyloid deposits in the aging cerebral cortex. *Am J Pathol* 145: 1358-1376
- Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L. (1993).** Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology* 43: 192-197
- Masters, C. L., Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. (1981).** The familial occurrence of Creutzfeldt-Jacob disease and Alzheimer's disease. *Brain* 104: 535-538
- Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N., Beyreuther, K. (1985 a).** Neuronal origin of a cerebral amyloid: Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 4: 2757-2763
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Muthaup, G., Mc Donald, D. L., Beyreuther, K. (1985b).** Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4245-4249
- Matthias, D., Jakob, W. (1968).** Untersuchungen über die Altersamyloidose des Hundes und ihre Stellung zur sogenannten typischen Amyloidose. *Zentralbl Veterinärmed A* 16: 477-494
- Mattson, M. P. (1997).** Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77: 1081-1132
- Maurer, K., Volk, S., Gerbaldo, H. (1997).** Auguste D. and Alzheimer's disease. *The Lancet* 349: 1546-1549
- Maury, C. P. (1991).** Immunohistochemical localization of amyloid in Finnish hereditary amyloidosis with antibodies to gelsolin peptides. *Lab Invest* 64: 400-404
- Mc Geer, P. L., Walker, D. G., Akiyama, H., Yasuhara, O., Mc Geer, E. G. (1994).** Involvement of microglia in Alzheimer's disease. *Appl Neurobiol* 20: 192-193
- Mc Kee, A. C., Kosik, K. S., Kowall, N. W. (1991).** Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 30: 156-165
- Mc Kenzie, J. E., Roberts, G. W., Royston, M. C. (1996).** Comparative investigation of neurofibrillary damage in the temporal lobe in Alzheimer's disease, Down's syndrome and dementia pugilistica. *Neurodeg* 5: 259-264

- Mc Lachlan, D. R., Bergeron, C., Smith, J. E., Boomer, D., Rifat, S. L. (1996).** Risk for neuropathologically confirmed Alzheimer's disease and residual aluminium in municipal drinking water employing weighted residential histories. *Neurology* 46: 401-405
- Mc Namara, M. J., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T. (1998).** Apolipoprotein E genotype and deposits of Abeta 40 and Abeta 42 in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 55: 1001-1004
- Meyer, R. K., Mc Kinley, M. P., Bowman, K. A., Braunfeld, M. B., Barry, R. A., Prusiner, S. B. (1986).** Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2310-2314
- Michell, A. R. (1999).** Longevity of british breeds of dogs and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. *Vet Rec* 145: 625-629
- Milgram, N. W., Ivy, G. O., Murphy, M. P., Head, E., Wu, P. H., Ruehl, W. W., Yu, P. H., Durden, D. A., Davis, B. A., Boulton, A. A. (1995).** Effects of chronic oral administration of L-deprenyl in the dog. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 421-428
- Mirra, S. S., Heyman, A., Mc Keel, D., Sumi, S. M., Crain, B. J., Brownlee, L. M., Vogel, F. S., Hughes, J. P., Van Belle, G., Berg, L. (1991).** The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41: 479-486
- Miura, K., Ju, S. T., Cohen, A. S., Shirahama, T. (1990).** Generation and use of site-specific antibodies to serum amyloid A for probing amyloid A development. *J Immunol* 144: 610-613
- Miyakawa, T., Shimoji, A., Kuramoto, R., Higuchi, Y. (1982).** The relationship between senile plaques and cerebral blood vessels in Alzheimer's disease and senile dementia. Morphological mechanism of senile plaque production. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 40: 121-129
- Mok, S. S., Evin, G., Li, Q., Smith, A. I., Beyreuther, K., Masters, C. L., Small, D. H. (1997).** A novel metalloprotease in rat brain cleaves the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease generating amyloidogenic fragments. *Biochem* 36: 156-163
- Mori, H., Ihara, Y. (1991).** Neurofibrillary tangles, dystrophic neurites (curly fibers), and abnormal phosphorylation of tau. *Brain Pathol* 1: 273-277
- Morris, J. C., Storandt, M., Mc Keel, D. W., Rubin, E. H., Price, J. L., Grant, E. A., Berg, L. (1996).** Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 46: 707-719

- Morys, J., Narkiewicz, O., Maciejewska, B., Wegiel, J., Wisniewski, H. M. (1994).** Amyloid deposits and loss of neurons in the claustrum of the aged dog. *Neuroreport* 5:1825-1828
- Mucchiano, G., Cornwell, G. G., Westermarck, P. (1992).** Senile aortic amyloid. Evidence for two distinct forms of localized deposits. *Am J Pathol* 140: 871-877
- Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L., Beyreuther, K. (1996).** The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper (II) to copper. *Science* 271: 1406-1409
- Nakamura, S., Nakayama, H., Uetsuka, K., Sasaki, N., Uchida K., Goto, N. (1995).** Senile plaques in an aged two-humped (Bactrian) camel (*Camelus bactrianus*). *Acta Neuropathol* 90: 415-418
- Nakamura, S., Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Ono, F., Sakakibara, I., Yoshikawa, Y., Goto, N., Doi, K. (1996a).** Immunohistochemical study on the deposition of apolipoprotein E in cerebral and islet amyloidoses in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Exp Anim* 45: 199-203
- Nakamura, S., Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Ono, F., Sakakibara, I., Yoshikawa, Y., Goto, N., Doi, K. (1996b).** Immunohistochemical characteristics of the constituents of senile plaques and amyloid angiopathy in aged cynomolgus monkeys. *J Med Primatol* 25: 294-300
- Nakamura, S., Nakayama, H., Kiatipattanasakul, W., Uetsuka, K., Uchida, K., Goto, N. (1996c).** Senile plaques in very aged cats. *Acta Neuropathol* 91:437-439
- Nakamura, S., Tamaoka, A., Sawamura, N., Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Shoji, S., Yoshikawa, Y., Doi, K. (1997).** Deposition of amyloid β protein ($A\beta$) subtypes [$A\beta$ 40 and $A\beta$ 42(43)] in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 94: 323-328
- Nakamura, Y., Takeda, M., Niigawa, H., Kametani, F., Hariguchi, S., Yoshida, I., Kitajima, S., Nishimura, T. (1994).** Accumulation of amyloid beta-protein precursor (APP) in Purkinje cells and increase of amino-terminal fragments of APP in cerebrum and cerebellum of aged rat brain. *Brain Res* 643: 319-323
- Nakayama, H., Katayama, K., Ikawa, A., Miyawaki, K., Shinozuka, J., Uetszka, K., Nakamura, S., Kimura, N., Yoshikawa, Y., Doi, K. (1999).** Cerebral amyloid angiopathy in an aged great spotted woodpecker (*Picoides major*). *Neurobiol Aging* 20: 53-56
- Nelson, P. T., Greenberg, S. G., Saper, C. B. (1994).** Neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of sheep. *Neurosci Lett* 170: 187-190

- Nelson, P. T., Saper, C. B. (1995).** Ultrastructure of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of sheep. *Neurobiol Aging* 16: 315-323
- Newberne, J. W., Robinson, V. B., Lilah Estill, M. T., Brinkmann, M. S. (1960).** Granular structures in the brains of apparently normal dogs. *Am J Vet Res* 782-786
- Newberne, P. M., Hare, W. V. (1962).** Axon dystrophy in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 403-411
- O'Brien, T. D., Butler, P. C., Westermark, P., Johnson, K. H. (1993).** Islet amyloid polypeptide: a review of its biology and potential roles in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Vet Pathol* 30: 317-332
- Okuda, R., Uchida, K., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Nakayama, H., Goto, N. (1994).** The distribution of amyloid beta precursor protein in canine brain. *Acta Neuropathol* 87: 161-167
- Ossowska, K. (1993).** Disturbances in neurotransmission processes in aging and age-related diseases. *Pol J Pharmacol* 45: 109-131
- Overmyer, M., Helisalmi, S., Soininen, H., Laakso, M., Riekkinen, H., Alafuzoff, I. (1999).** Reactive microglia in aging and dementia: an immunohistochemical study of postmortem human brain tissue. *Acta Neuropathol* 97: 383-392
- Pantelakis, S. (1954).** Un type particulier d'angiopathie senile du systeme nerveux central: l'angiopathie congophile. Topographie et frequence. *Monatsschr Psychiat Neurol* 128: 219-256
- Papaioannou, N., Tooten, C. J., van Ederen, A. M., Rofina, J., Tsangaris, T., Bohl, R. E., Gruys, E. (2000).** The brain of aged dogs contains neuro-fibrillary tangles and 4-hydroxynonenal-positive senile plaques. Poster Präsentation, 18. Treffen der Europäischen Gesellschaft für Veterinär Pathologie, Amsterdam, Niederlande, 2000
- Pauli, B., Luginbühl, H. (1971).** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der cerebralen Amyloidose bei alten Hunden und senilen Menschen. *Acta Neuropathol* 19: 121-128
- Perlmutter, R. S., Barron, E., Chang Chui, H. (1990).** Morphological association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 119: 32-36
- Perry, E., Kay, D. W. K. (1997).** Some developments in brain ageing and dementia. *Biomed Sci* 54: 201-215
- Pierce, J. E., Trojanowski, J. Q., Graham, D. I., Smith, D. H., Mc Intosh, T. K. (1996).** Immunohistochemical characterization of alterations in the distribution of amyloid precursor proteins and beta-amyloid peptide after experimental brain injury in the rat. *J Neurosci* 16: 1083-1090

- Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., Cotman, C. W. (1993).** Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13: 1676-1687
- Pike, C. J., Cummings, B. J., Cotman, C. W. (1995a).** Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 132: 172-179
- Pike, C. J., Walencewicz-Wassermann, A. J., Kosmoski, J., Cribbs, D. H., Glabe, C. G., Cotman, C. W. (1995b).** Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* 64: 253-265
- Podlisny, M. B., Tolan, D. R., Selkoe, D. J. (1991).** Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 138: 1423-1435
- Praprotnik, D., Smith, M. A., Richey, P. L., Vinters, H. V., Perry, G. (1996).** Filament heterogeneity within the dystrophic neurites of senile plaques suggests blockage of fast axonal transport in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 91: 226-235
- Price, D. L., Cork, L. C., Struble, R. G., Kitt, C. A., Walker, L. C., Powers, R. E., Whitehouse, P. J., Griffin, J. W. (1987).** Dysfunction and death of neurons in human degenerative neurological diseases and in animal models. *Ciba Found Symp* 126: 30-48
- Price, D. L., Martin, L. J., Sisodia, S. S., Wagster, M. V., Koo, E. H., Walker, L. C., Cork, L. C. (1991).** Aged non-human primates: an animal model of age-associated neurodegenerative disease. *Brain Pathol* 1: 287-296
- Prior, R., D'Urso, D., Frank, R., Prikulis, I., Pavlakovic, G. (1995).** Experimental deposition of Alzheimer amyloid beta-protein in canine leptomeningeal vessels. *Neuroreport* 6: 1747-1751
- Probst, A., Anderton, B. H., Brion, J. P., Ulrich J. (1989).** Senile plaque neurites fail to demonstrate anti-paired helical filament and anti-microtubule-associated protein-tau immunoreactive proteins in the absence of neurofibrillary tangles in the neocortex. *Acta Neuropathol* 77:430-436
- Probst, A., Langui, D., Ulrich, J. (1991).** Alzheimer's disease: A description of the structural lesions. *Brain Pathol* 1: 229-239
- Prusiner, S. B. (1982).** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144
- Puchtler, H., Sweat, L., Levin, M. (1962).** On the binding of congo red by amyloid. *J Histochem Cytochem* 10: 355-364

- Ramos-Vara, J. A., Takahashi, M., Ishihara, T., Miller, M. A., Pace, L. W., Craft, D., Common, R., Watson, G. L. (1998).** Intestinal extramedullary plasmocytoma associated with amyloid deposition in three dogs: an ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Ultrastruct Pathol* 22: 393-400.
- Read, D. H., Jolly, R. D., Alley, M. R. (1977).** Polioencephalomalacia of dogs with thiamine deficiency. *Vet Pathol* 14: 103-112
- Reifinger, M. (1997).** Volumetric examination of senile brain involution in dogs. *Anat Histol Embryol* 26: 141-146
- Roberson, M. R., Harrell, L. E. (1997).** Cholinergic activity and amyloid precursor protein metabolism. *Brain Res Brain Res Rev* 25: 50-69
- Rocca, W. A., Hofman, A., Brayne, C., Breteler, M. M., Clarke, M., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Engedal, K., Hagnell, O., Heeren, T. J. (1991).** Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: A collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann Neurol* 30: 381-390
- Roertgen, K. E., Lund, E. M., O'Brien, T. D., Westermarck, P., Hayden, D. W., Johnson, K. H. (1995).** Apolipoprotein AI-derived pulmonary vascular amyloid in aged dogs. *Am J Pathol* 147: 1311-1317
- Roertgen, K. E., Parisi, J. E., Clark, B., Barnes, D. L., O'Brien, T. D., Johnson, K. H. (1996).** A β -associated cerebral angiopathy and senile plaques with neurofibrillary tangles and cerebral hemorrhage in an aged wolverine (*Gulo gulo*). *Neurobiol Aging* 17: 243-247
- Roher, A., Gray, E. G., Paula-Barbarosa, M. (1988).** Alzheimer's disease: Coated vesicles, coated pits and the amyloid-related cells. *Proc R Soc Lond* 232: 367-373
- Romeis, B. (1989).** Mikroskopische Technik. 17. Auflage, Urban und Schwarzenberg Verlag, München
- Rosenwald, A., Reusche, E., Ogomori, K., Teichert, H. M. (1993).** Comparison of silver stainings and immunohistology for the detection of neurofibrillary tangles and extracellular cerebral amyloid in paraffin sections. *Acta Neuropathol* 86: 182-186
- Roses, A. D. (1996).** The Alzheimer disease. *Curr Opin Neurobiol* 6: 644-650
- Rozemuller, J. M., Eikelenboom, P., Stam, F. C., Beyreuther K., Masters, C. L. (1989).** A4 protein in Alzheimer's disease: Primary and secondary cellular events in extracellular amyloid deposition. *J Neuropathol Exp Neurol* 48: 674-691
- Ruehl, W. W., De Paoli, A. C., Bruyette, D. S. (1994).** L-deprenyl for treatment of behavioral and cognitive problems in dogs: preliminary report of an open label trial. *Appl Anim Behav Sci* 39: 191-192

- Ruehl, W. W., Bruyette, D. S., De Paoli, A., Cotman, C. W., Head, E., Milgram, N. W., Cummings, B. J. (1995).** Canine cognitive dysfunction as a model for human age-related cognitive decline, dementia and Alzheimer's disease: clinical presentation, cognitive testing, pathology and response to L-deprenyl therapy. *Prog Brain Res* 106: 217-225
- Ruehl, W. W., Entriken, T. L., Muggenburg, B. A., Bruyette, D. S., Griffith, W. C., Hahn, F. F. (1997).** Treatment with L-deprenyl prolongs life in elderly dogs. *Life Sci* 61: 1037-1044
- Ruehl, W. W., Neilson, J., Hart, B., Head, E., Bruyette, D. S., Cummings, B. J. (1998).** Therapeutic actions of L-deprenyl in dogs: a model of human brain aging. *Adv Pharmacol* 42: 316-319
- Rumble, B., Retallack, R., Hilbich, C., Simms, G., Multhaup, G., Martins, R., Hockey, A., Montgomery, P., Beyreuther, K., Masters, C. L. (1989).** Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 320: 1446-1452
- Russel, M. J., White, R., Patel, E., Markesbery, W., Watson, C., Geddes, J. (1992).** Familial influence on plaque formation in the beagle brain. *Neuroreport* 3: 1093-1096
- Russel, M. J., Bobik, M., Russel, G. W., Hou, Y., Benjamin, S. A., Geddes, J. W. (1996).** Age-specific onset of β -amyloid in beagle brain. *Neurobiol Aging* 17: 269-273
- Samuel, W., Masliah, E., Hill, L. R., Butters, N., Terry, R. (1994).** Hippocampal connectivity and Alzheimer's dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model. *Neurol* 44: 2081-2088
- Sasaki, A., Yamaguchi, H., Ogawa, A., Sugihara, S., Nakakzato, Y. (1997).** Microglial activation in early stages of amyloid β protein deposition. *Acta Neuropathol* 94: 316-322
- Satou, T., Cummings, B. J., Head, E., Nielson, K. A., Hahn, F. F., Milgram, N. W., Velazquez, P., Cribbs, D. H., Tenner, A. J., Cotman, C. C. (1997).** The progression of β -amyloid deposition in the frontal cortex of the aged canine. *Brain Res* 774: 35-43
- Sawada, H., Udaka, F., Izumi, Y., Nashinaka, K., Kawakami, H., Nakamura, S., Kameyama, M. (2000).** Cerebral white matter lesions are not associated with apoE genotype but with age and female sex in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 68: 653-656
- Schroder, R., Linke, R. P. (1999).** Cerebrovascular involvement in systemic AA and AL amyloidosis: a clear haematogenic pattern. *Virch Arch* 434: 551-560
- Schuh, J. C. L. (1988).** Pulmonary amyloidosis in a dog. *Vet Pathol* 25: 102-104
- Selkoe, D. J., Abraham, C. R., Podlisny, M. B., Duffy, L. K. (1986).** Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 146: 1820-1834

- Selkoe, D. J., Bell, D. S., Podlisny, M. B., Price, D. L., Cork, L. C. (1987).** Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* 235: 873-877
- Selkoe, D. J. (1994).** Cell biology of the amyloid β -protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol* 10: 373-403
- Selkoe, D. J. (1999).** Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399: 23-31
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindelhurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I., Schenk, D. (1992).** Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature* 359: 325-327
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., Bryant, K., Fritz, L. C., Galasko, D., Thal, L. J., Lieberburg, I., Schenk, D. B. (1993).** Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature* 361: 260-263
- Sheffield, L. G., Berman, N. E. (1998).** Microglial expression of MHC class II increases in normal aging of nonhuman primates. *Neurobiol Aging* 19: 47-55
- Sheng, J. G., Mrak, R. E., Griffin, W. S. T. (1997a).** Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1 α ⁺ microglia and S100 β ⁺ astrocytes with neurofibrillary tangle stages. *J Neurol Exp Neuropathol* 56: 285-290
- Sheng, J. G., Mrak, R. E., Griffin, W. S. T. (1997b).** Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms. *Acta Neuropathol* 94: 1-5
- Shimada, A., Kuwamura, M., Umemura, T., Takada, K., Ohama, E., Itakura, C. (1991).** Modified Bielschowsky and immunohistochemical studies on senile plaques in aged dogs. *Neurosci Lett* 129: 25-28
- Shimada, A., Kuwamura, M., Awakura, T., Umemura, T., Itakura, C. (1992).** An immunohistological and ultrastructural study on age-related astrocytic gliosis in the central nervous system of dogs. *J Vet Med Sci* 54: 29-36
- Shinkai, Y., Yoshimura, M., Ito, Y., Odaka, A., Suzuki, N., Yanagisawa, K., Ihara, Y. (1995).** Amyloid beta-proteins 1-40 and 1-42(43) in the soluble fraction of extra- and intracranial blood vessels. *Ann Neurol* 38: 421-428

- Shirahama T., Cohen A. S. (1985).** Immunocytochemical study of hepatocyte synthesis of amyloid AA. Demonstration of usual site of synthesis and intracellular pathways but unusual retention on the surface membrane. *Am J Pathol* 118: 108-115
- Simchowicz, T. (1911).** Histologische Studien ueber die senile Demenz. In: F. Nissl und A. Alzheimer: Histologische und Histopathologische Arbeiten über die Grosshirnrinde. Bd.: 4: 267-444
- Simons, E. R., Marshall., D. C. L., Long, H. J., Otto, K., Billingslea, A., Tibbles, H., Wells, J., Eisenhauer, P., Fine, R. E., Cribbs, D. H ., Davies, T. A., Abraham, C. R. (1998).** Blood brain barrier endothelial cells express candidate amyloid precursor protein-cleaving secretases. *Amyloid* 5: 153-162
- Sisodia, S. S. (1992).** β -amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci* 89: 6075-6079
- Slauson, D. O., Gribble, D. H., Russel, S.W. (1970).** A clinical pathological study of renal amyloidosis in dogs. *J Comp Pathol* 80: 335-343
- Sloane, J. A., Pietropaolo, M. F., Rosene, D. L., Moss, M. B., Peters, A., Kemper, T., Abraham, C. R. (1997).** Lack of correlation between plaque burden and cognition in the aged monkey. *Acta Neuropathol* 94: 471-478
- Sloane, J. A., Hollander, W., Moss, M. B., Rosene, D. L., Abraham, C. R. (1999).** Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. *Neurobiol Aging* 20: 395-405
- Sloane , J. A., Hollander, W., Rosene, D. L., Moss, M. B., Kemper, T., Abraham, C. R. (2000).** Astrocytic hypertrophy and altered GFAP degradation with age in subcortical white matter of the rhesus monkey. *Brain Res* 862: 1-10
- Small, D. H., Nurcombe, V., Moir, R., Michaelson, S., Monard, D., Beyreuther, K., Masters, C. L. (1992).** Association and release of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease from chick brain extracellular matrix. *J Neurosci* 12: 4143-4150
- Smith, D. H., Chen, X. H., Nonaka, M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Saatman, K. E., Leoni, M. J., Xu, B. N., Wolf, J. A., Meaney, D. F. (1999).** Accumulation of amyloid beta and tau and the formation of neurofilament inclusions following diffuse brain injury in the pig. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 982-992
- Steward, O. (1976).** Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal fromation of the rat. *J Comp Neurol* 167: 285-314

- Storkel, S., Bohl, J., Schneider, H. M. (1983).** Senile amyloidosis: principles of localisation in a heterogeneous form of amyloidosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 44: 145-161
- Su, M. Y., Head, E., Brooks, W. M., Wang, Z., Muggenburg, B. A., Adam, G. E., Sutherland, R., Cotman, C. W., Nalcioglu, O. (1998).** Magnetic resonance imaging of anatomic and vascular characteristics in a canine model of human aging. *Neurobiol Aging* 19: 479-485
- Suh, Y., Choi, W., Kim, S., Kim, J., Rhi, B., Chong, Y., Woo, J. I., Lee, K. (1997).** Expression of Alzheimer's amyloid precursor protein in human lymphocytes. *Arch Gerontol Geriatr* 24: 1-7
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Eckman, C., Golde, T. E., Younkin, S. G. (1994).** An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264: 1336-1340
- Tabaton, M., Cammarata, S., Mancardi, G., Manetto, V., Autilio-Gambetti, L., Perry, G., Gambetti, P. (1991).** Ultrastructural localization of beta-amyloid, tau, and ubiquitin epitopes in extracellular neurofibrillary tangles. *Proc Natl Acad Sci* 88: 2098-2102
- Tagliavini, F., Giaccone, G., Frangione, B., Bugiani, O. (1988).** Pre-amyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci Lett* 93: 191-196
- Takahashi, M., Yokota, T., Yamashita, Y., Ishihara, T., Uchino, F. (1985).** Ultrastructural evidence for the synthesis of serum amyloid A protein by murine hepatocytes. *Lab Invest* 52: 220-223
- Tang, M., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H., Mayeux, R. (1996).** Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348: 429-432
- Tanzi, R. E., Mc Clatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F., Neve, R. L. (1988).** Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331: 528-530
- Tarkoski, E., Blennow, K., Wallin, A., Tarkowski, A. (1999).** Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol* 19: 223-230
- Tekirian, T. L., Cole, G. M., Russell, M. J., Yang, F., Wekstein, D. R., Patel, E., Snowden, D. A., Markesbery, W. R., Geddes, J. W. (1996).** Carboxy terminal of β -amyloid deposits in aged human, canine, and polar bear brains. *Neurobiol Aging* 17: 249-257

- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., De Teresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., Katzman, R. (1991).** Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 41: 572-580
- Thal, D. R., Glas, A., Schneider, W., Schober, R. (1997).** Differential pattern of β -amyloid, amyloid precursor protein and apolipoprotein E expression in cortical senile plaques. *Acta Neuropathol* 94: 255-265
- Tomlinson, B. E. (1979).** Morphological brain changes in non-demented old people. In: von Praag H. M., Kalverboer, A. F. eds. *Aging of the central nervous system*. New York: DeErvon F. Bohn. 37-57
- Uchida, K., Miyauchi, Y., Nakayama, H., Goto, N. (1990).** Amyloid angiopathy with cerebral hemorrhage and senile plaques in dogs. *Jpn J Vet Sci* 52: 605-611
- Uchida, K., Nakayama, H., Goto, N. (1991).** Pathological studies on cerebral amyloid angiopathy, senile plaques and amyloid deposition in visceral organs in aged dogs. *J Vet Med Sci* 53: 1037-1042
- Uchida, K., Nakayama, H., Tateyama, S., Goto, N. (1992a).** Immunohistochemical analysis of constituents of senile plaques and cerebrovascular amyloid in aged dogs. *J Vet Med Sci* 54: 1023-1029
- Uchida, K., Tani, Y., Uetsuka, K., Nakayama, H., Goto, N. (1992b).** Immunohistochemical studies on canine cerebral amyloid angiopathy and senile plaques. *J Vet Med Sci* 54: 659-667
- Uchida, K., Okuda, R., Yamaguchi, R., Tateyama, S., Nakayama, H., Goto, N. (1993).** Double-labeling immunohistochemical studies on canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *J Vet Med Sci* 55: 637-642
- Uchida, K., Yoshino, T., Yamaguchi, R., Tateyama, S., Kimoto, Y., Nakayama, H., Goto, N. (1995).** Senile plaques and other senile changes in the brain of an aged American black bear. *Vet Pathol* 32: 412-414
- Uchida, K., Kuroki, K., Yoshino, T., Yamaguchi, R., Tateyama, S. (1997).** Immunohistochemical study of constituents other than beta-protein in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 93: 277-284
- Uno, H., Alsum, P. B., Dong, S., Richardson, R., Zimbric, M. L., Thieme, C. S., Houser, W. D. (1996).** Cerebral amyloid angiopathy and plaques, and visceral amyloidosis in aged macaques. *Neurobiol Aging* 17: 275-281
- Van der Linde-Sipman, J. S., Niewold, T. A., Tooten, P. C. J., De Neijls-Backer, M., Gruys, E. (1997).** Generalized AA-amyloidosis in Siamese and Oriental cats. *Vet Immunol Immunopathol* 56: 1-10

- Vinters, H. V., Pardridge, W. M., Secor, D. L., Ishii, N. (1988).** Immunohistochemical study of cerebral amyloid angiopathy. II. Enhancement of immunostaining using formic acid pretreatment of tissue sections. *Am J Pathol* 133: 150-162
- Von Braunnmühl, A. (1956).** „Kongophile Angiopathie“ und „senile Plaques“ bei greisen Hunden. *Arch Psychiat Neurol* 194: 396-414
- Wakati, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Ohnishi, K., Nakamura, S., Kimura, J. (1992).** Regional accumulation of amyloid beta/A4 protein precursor in the gerbil brain following transient cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 146: 135-138
- Walker, L. C., Masters, C., Beyreuther, K., Price, D. L. (1990).** Amyloid in the brains of aged squirrel monkeys. *Acta Neuropathol* 80: 381-187
- Walker, L. C. (1997).** Animal models of cerebral beta-amyloid angiopathy. *Brain Res Brain Res Rev* 25: 70-84
- Wegiel, J., Wisniewski, H. M., Dziewiatkowski, J., Tarnawski, M., Dziewiatkowska, A., Soltysiak, Z. (1995).** The origin of amyloid in cerebral vessels of aged dogs. *Brain Res* 705: 225-234
- Wegiel, J., Wisniewski, H. M., Dziewiatkowski J., Tarnawski, M., Dziewiatkowska, A., Morys, J., Soltysiak, Z., Kim, K. S. (1996).** Subpopulation of dogs with severe brain parenchymal beta amyloidosis distinguished with cluster analysis. *Brain Res* 728: 20-26
- Wegiel, J., Wisniewski, H. M., Soltysiak, Z. (1998).** Region- and cell-type-specific pattern of tau phosphorylation in dog brain. *Brain Res* 802: 259-266
- Wells, G. A., Wilesmith, J. W., Mc Gill, I. S. (1991).** Bovine spongiforme encephalopathy: a neuropathological perspective. *Brain Pathol* 1: 69-78
- Wen, G. Y., Wisniewski, H. M., Shek, J. W. (1985).** Neurofibrillary changes and Pick's bodies in the aged dog. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 366-367
- Westermarck, P. (1998).** The pathogenesis of amyloidosis. *Am J Pathol* 152: 1125-1127
- Wiltfang, J., Smirnov, A., Schnierstein, B., Kelemen, G., Matthies, U., Klafki, H. W., Staufenbiel, M., Huther, G., Ruther, E., Kornhuber, J. (1997).** Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A beta) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis* 18: 527-532
- Wisniewski, H. M., Johnson, A. B., Raine, C. S., Kay, W. J., Terry, R. D. (1970).** Senile plaques and cerebral amyloidosis in aged dogs: A histochemical and ultrastructural study. *Lab Invest* 23: 287-296
- Wisniewski, H. M., Wegiel, J., Wang, K. C., Kujawa, M., Lach, B. (1989).** Ultrastructural studies of the cells forming fibers in classical plaques. *J Can Sci Neurol* 16: 535-542

- Wisniewski, T., Lalowski, M., Bobik, M., Russell, M., Strosznajder, J., Frangione, B. (1996).** Amyloid beta 1-42 deposits do not lead to Alzheimer's neuritic plaques in aged dogs. *Biochem J* 313: 575-580
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., Selkoe, D. J. (1999).** Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* 398: 513-517
- Wünschmann, A. (1998).** Phänotypische Identifizierung von Lymphozyten in lymphatischen Organen und im Gehirn von Hunden mit natürlicher Staupevirusinfektion. *Vet. med. Diss., Gießen*
- Wünschmann, A., Kremmer, E., Baumgärtner, W. (2000).** Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 73: 83-98
- Wrzolek, M. A., Merz, P. A., Kasczak, R., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Rubenstein, R., Tonna-De Masi, M., Goller, N. L., Metha, P., Wisniewski, H. M. (1992).** Immune electron microscopic characterization of monoclonal antibodies to Alzheimer neurofibrillary tangles. *Am J Pathol* 141: 343-355
- Xia, M., Berezovska, O., Kim, T., Xia, W., Liao, A., Tanzi, R. E., Selkoe, D., Hyman, B. T. (1998a).** Lack of specific association of presenilin 1 (PS-1) protein with plaques and tangles in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 158: 15-23
- Xia, W., Zhang, J., Ostaszewski, B. L., Kimberly, W. T., Seubert, P., Koo, E. H., Shen, J., Selkoe, D. J. (1998b).** Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry* 37: 16465-16471
- Yamada, M., Itoh, Y., Suematsu, N., Otomo, E., Matsushita, M. (1996).** Apolipoprotein E genotype in elderly nondemented subjects without senile changes in the brain. *Ann Neurol* 40: 243-245
- Yamaguchi, H., Hirai, S., Morimatsu, M., Shoji, M., Harigaya, Y. (1988).** Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol* 77: 113-119
- Yamaguchi, H., Hirai, S., Shoji, M., Harigaya, Y., Okamoto, Y., Nakazato, Y. (1989).** Alzheimer type dementia: diffuse type of senile plaques demonstrated by beta protein immunostaining. *Prog Clin Biol Res* 317: 467-474
- Yamaguchi, H., Nakazato, Y., Hirai, S., Shoji, M. (1990).** Immunoelectron microscopic localisation of amyloid β protein in the diffuse plaques of the Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 508: 320-324

- Yamaguchi, H., Yamazaki, T., Lemere, C. A., Frosch, M. P., Selkoe, D. J. (1992).** Beta amyloid is focally deposited within the outer basement membrane in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 141: 249-159
- Yamaguchi, H., Sugihara, S., Ogawa, A., Saido, T. C., Ihara, Y. (1998).** Diffuse plaques associated with astroglial amyloid β protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol* 95: 217-222
- Yamamoto, T., Hirano, A. (1986).** A comparative study of modified Bielschowsky, Bodian, and Thioflavin S stains on Alzheimer's neurofibrillary tangles. *Neuropathol Appl Neurobiol* 12: 3-9
- Yan, S. D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A. M. (1996).** RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382: 685-691
- Yan, S. D., Fu, J., Soto, C., Chen, X., Zhu, H., Al-Mohanna, F., Collison, K., Zhu, A., Stern, E., Saido, T., Tohyama, M., Ogawa, S., Roher, A., Stern, D. (1997).** An intracellular protein that binds amyloid- β peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 389: 689-695
- Yano, B. L., Hayden, D. W., Johnson, K. H. (1981).** Feline insular amyloid. *Vet Pathol* 18: 621-627
- Yi, S., Takahashi, K., Naito, M., Tashiro, F., Wakasugi, S., Maeda, S., Shimada, K., Yamamura, K., Araki, S. (1991).** Systemic amyloidosis in transgenic mice carrying the human mutant transthyretin (Met 30) gene. Pathologic similarity to human familial amyloidotic polyneuropathy, type I. *Am J Pathol* 138: 403-412
- Yoshino, T., Uchida, K., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Nakayama, H., Goto, N. (1996).** A retrospective study of canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Vet Pathol* 33: 230-234
- Younkin, S. G. (1991).** Processing of the Alzheimer's disease β A4 amyloid protein precursor (APP). *Brain Pathol* 1: 253-262

9 Anhang

9.1 Bezugsquellen für Chemikalien und Antikörper

Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim

anti-humaner Alzheimer Precursor Protein A4-Antikörper aus der Maus
Klon 22C11, 1285262
in Situ Cell Death Detection Kit, AP, 1684809
Proteinase K, 1413783

Dako Diagnostica, Hamburg

anti-humaner Gliafaserprotein-Antikörper aus dem Kaninchen, Z 334
anti-humaner Vimentin-Antikörper aus der Maus, Klon V9, M 725
anti-humaner Neurofilament-Antikörper aus der Maus, Klon 2F11, M 762
Dako Glycergel Mounting Medium, C 563

DCS Innovative Diagnostiksysteme, Hamburg

Fast Red Substrate Pack

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm

Ammoniumhydroxid-Lösung purum 28%ig in Wasser, 09858
Ameisensäure puriss. p. a., 06440
Imidazol puriss. p. a., 56750
Isopentan (2-Methylbutan), 59075
3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) purum p. a., 32750
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 93352
Trypsin aus Schweinepankreas (ca. 90 U/mg), 93613
Wolframatokieselsäure-Hydrat, 95395

Genzyme Diagnostics, Rüsselsheim

anti-humaner-Interleukin-1-, -6-, -12- und TNF- α -Antikörper aus dem Kaninchen

GSF-National Research Center for Environment and Health, München

anti-kaniner-Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II aus der Ratte, Klon R4A1

Hecht I., Kiel-Hassee

Eukitt[®] (Corbit-Balsam)

Karstadt AG, Gießen

Kupferdraht, 0,25 mm, unbeschichtet

Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande

TUF ("target unmasking fluid"), SP-0025

Merck E., Darmstadt

Albumosesilber für die Mikroskopie, 7447

Ammoniumnitrat p. a., 1188

Äthanol (Alkohol) absolut p. a., 972

Calciumchlorid-2-hydrat krist. p.a., 2382

Eosin (gelblich), 1345

Essigsäure p. a., 63

Gelatine (gepulvert), 4078

Hämatoxylin, 4305

Hydrochinon Fotopur[®], 4610

Methanol reinst, 6008

Methenamin p. a., 4343

Natriumacetat, 6268

Kaliumcarbonat p. a., 4928

Kaliumjodid Suprapur[®], 5044

Kongorot, 1340

Natriumacetat wasserfrei p.a., 6268

Natriumcarbonat wasserfrei p.a., 6392

Natriumchlorid reinst, 6400

Natriumhydroxid-Plätzchen p. a., 6498

Natriumthiosulfat-Pentahydrat p. a., 6516

Oxalsäure p. a., 495

Papanicolaou-Lösung 1b, 9254
Perhydrol® 30%ig H₂O₂ p. a., 7210
2-Propanol (Isopropylalkohol) reinst, 8995
Pyridin p. a., 22301
Titrisol® (1 N HCl) 1M/l, 9970
Xylol reinst, 8685

Novocastra Laboratories Ltd., über Medac Diagnostica, Hamburg

anti-humaner Beta-Amyloid-Antikörper aus der Maus, Klon 6F/3D, NCL-B-Amyloid

PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

Pferdeserum (unverdünnt), B 15-023
Schweineserum (unverdünnt), B15-030
Eagle's Minimal Essential Medium mit Earle'scher Salzlösung und Glutamin, E15-825

Riedel De Haen, Seelze

Lanthannitrat-6-Hydrat p. a., 31617

Roth C., Karlsruhe

Zitronensäure wasserfrei, 6490
Formaldehyd 36%ig, 7398
Methanol 99,8%ig p. p., 4627
Roti®-Histol, 6640
Salpetersäure Rotipuran®, 4989
Silbernitrat Rotipuran®, 7908
Tetrachlorgold(III)-säure Aquat purum, 3867

Serva, Heidelberg

Triton®X-100, 37240

Sigma, Deisenhofen

Lektin aus Bandeiraea simplicifolia BS-1 (biotiniliert), L-3759

Vogel GmbH & Co KG, Gießen

Tissue Tec[®] O.C.T.-Einbettmittel, LT 45839

Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, über Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden

Vectastain ABC-Kit, Standard, PK 4000

biotiniliertes Pferd anti-Maus-Immunglobulin, BA 2000

biotiniliertes Kaninchen anti-Ratte-Immunglobulin, BA 4000

biotiniliertes Ziege anti-Kaninchen-Immunglobulin, BA 1000

9.2 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

Biozym, Deutschland

Gel Bond[®]-Film, 53748

Menzel Gläser, Glasbearbeitungswerke GmbH & CoKG, Braunschweig

Superfrost Plus[®]-Objektträger, 041300

Olympus, Hamburg

Netzmikrometerplatte U-OCMSQ 10/10, 034077

Reichert-Jung GmbH, Nußloch

Kryotom Frigocut, Modell 2700

Schleicher & Schuell, Dassel

Papierfilter, 110 mm Durchmesser, 311643

Science Service (SCI), München

Pap-Pen[®]

9.3 Lösungen und Puffer

9.3.1 Immunhistologie

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochloridlösung (DAB):

100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer), anschließend filtrieren und 70 µl H₂O₂ (30%ig) zugeben.

0,5%iges H₂O₂ in Methanol oder TBS für Paraffinschnitte:

1,5 ml 30%iges H₂O₂ in 100 ml Methanol geben.

0,03%iges H₂O₂ in TBS für Gefrierschnitte:

90 µl 30%iges H₂O₂ in 100 ml TBS geben.

0,1 M Imidazol/HCl-Puffer, pH 7,1:

6,81 g Imidazol mit 1000 ml Aqua dest. lösen und ca. 500 ml 0,1 M HCl zufügen bis pH-Wert 7,1 eingestellt ist.

Tris-Puffer-Stammlösung ("tris-buffered saline", TBS), pH 7,6:

Stammlösung: 60,57 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan in 610 ml Aqua dest. lösen und ca. 390 ml 1 N HCl (Titrisol[®]) zufügen bis pH-Wert 7,6 eingestellt ist.

Gebrauchslösung: 100 ml Stammlösung auf 1000 ml mit 0,8%iger NaCl-Lösung in Aqua dest. auffüllen.

Papanicolaou Lösung:

Papanicolaou-Lösung und Aqua dest. im Verhältnis 1: 20 mischen und filtrieren.

Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung ("phosphate buffered saline", PBS), pH 7,4:

21,76 g Natriumchlorid, kristallin

3,592 g Natriumhydrogen-Phosphat p.a.

0,544 g Kaliumhydrogenphosphat p.a.

in 420 ml Aqua dest. lösen.

9.3.2 Histochemie

9.3.2.1 Lösungen für die Silberfärbung nach Campbell-Switzer

Silberfärbelösung:

- 60 Teile 1%ige Silbernitratlösung
- 5 Teile Pyridin (Fertiglösung, Fa. Merck)
- 45 Teile 1%ige Kaliumcarbonatlösung

Diese Lösung muß jedesmal frisch angesetzt werden. Die Lösungen werden in der oben angegebenen Reihenfolge nacheinander auf einem Magnetrührer gemischt. Das Pyridin wird im Kühlschrank aufbewahrt und sollte unter einem Abzug in die Lösung gemischt werden, da es sehr stark riecht (gesundheitsschädlich).

1%ige Silbernitratlösung:

- 1 g Silbernitrat
- ad 100 ml Aqua dest.
- (Braunglasflasche)

1% ige Kaliumcarbonatlösung:

- 1 g Kaliumcarbonat
- ad 100 ml Aqua dest.

0,5%ige Essigsäure:

- 5 ml Essigsäure (99,7%ig)
- ad 1000 ml Aqua dest.

1%ige Natriumthiosulfat-Pentahydratlösung:

- 1 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat
- ad 100 ml Aqua dest.

0,1%ige Goldchloridlösung:

- 0,5 g Tetrachlorgold(III)-säure Aquat
- ad 500 ml Aqua dest.

Die Lösung kann rückfiltriert und mehrmals gebraucht werden. Die Aufbewahrung muß in einer Braunglasflasche erfolgen.

Physikalischer Entwickler (Gemisch aus Lösung A, B und C).

Lösung A:

50 g Natriumcarbonat

1000 ml Aqua dest.

Lösung B:

2 g Ammoniumnitrat

2 g Silbernitrat

10 g Wolframatokieselsäure-Hydrat

1000 ml Aqua dest.

Lösung C:

2 g Ammoniumnitrat

2 g Silbernitrat

10 g Wolframatokieselsäure

7,3 ml 36%iges Formaldehyd

1000 ml Aqua dest.

Der physikalische Entwickler wird in folgender Reihenfolge auf einem Magnetrührer jedesmal frisch gemischt:

50 Teile Lösung A

45 Teile Lösung B in A

5 Teile Lösung C in A+B

Die Lösungen A, B und C können mehrere Monate aufgehoben werden, wobei Lösungen B und C in Braunglasflaschen aufbewahrt werden müssen.

9.3.2.2 Lösungen für die Silberfärbung nach Reusche

Silberfärbelösung (Gemisch aus Lösung A und B):

Lösung A:

2 g Gelatine

ad 100 ml 1%ige Ameisensäure

Lösung B:

50 g Silbernitrat

100 ml Aqua dest.

(2 Wochen stehen lassen bis zur Verwendung)

Kurz vor der Färbung wird die Silberfärbelösung aus Lösung A und B im Verhältnis 1:2 auf einem Magnetprüher jedesmal frisch hergestellt.

3%ige Natriumthiosulfat-Pentahydratlösung:

3 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat

ad 100 ml Aqua dest.

9.3.2.3 Lösungen für die Färbung nach Bielschowsky (modifiziert)

Ammoniakalische Silbernitratlösung:

Konzentrierte Ammoniumhydroxid-Lösung purum, 28%ig in Wasser (Fluka), wird auf einem Magnetprüher tropfenweise in 17%ige Silbernitratlösung gegeben, bis sich der gebildete grauschwarze Niederschlag wieder löst und die Lösung klar wird.

17%ige Silbernitratlösung:

20 g Silbernitrat

100 ml Aqua dest.

0,3%ige Ammoniaklösung:

1 ml Ammoniumhydroxid-Lösung purum, 28%ig in Wasser (Fluka)

100 ml Aqua dest.

Ammoniakalische Entwicklerlösung:

6 Tropfen des Entwicklers werden in 50 ml ammoniakalische Silbernitratlösung gegeben.

Entwickler:

20 ml 10%iges Formalin

100 ml Aqua dest.

1 Tropfen Salpetersäure

0,5 g Zitronensäure

Der Entwickler kann mehrere Wochen in einer Braunglasflasche aufbewahrt werden.

10%iges Formalin:

10 ml 36%iges Formaldehyd

90 ml Aqua dest.

9.3.2.4 Lösungen für die Silberfärbung nach Bodian (modifiziert)

1%ige Albumosesilber-Methenaminlösung:

1 g Albumosesilber

100 ml einer auf 37 °C vorgewärmten 5%igen Methenaminlösung

Diese Lösung wird jedesmal frisch angesetzt. Das Albumosesilber-Pulver vorsichtig über die Methenaminlösung streuen und nicht rühren, da sich sonst Klumpen bilden.

5%ige Methenaminlösung:

5 g Hexamethylenamintetramin (Methenamin)

ad 100 ml Aqua dest.

Diese Lösung wird jedesmal frisch angesetzt.

1%ige Hydrochinonlösung:

1 g Hydrochinon

ad 100 ml Aqua dest.

Diese Lösung wird am ersten Tag der Färbung jedesmal frisch angesetzt und bleibt über Nacht stehen. Am nächsten Tag werden 5 ml 36%iges Formaldehyd zugesetzt.

0,5%ige Goldchloridlösung:

1 g Tetrachlorgold(III)-säure Aquat

ad 200 ml Aqua dest.

1 Tropfen Eisessig (97%ige Essigsäure)

Diese Lösung kann rückfiltriert und mehrmals verwendet werden.

9.3.2.5 Lösungen für die Silberfärbung nach Gallyas

Lanthannitrat-Natriumacetatlösung:

8 Teile Aqua dest.

1 Teil einer 20%igen Natriumacetatlösung

1 Teil einer 100 mM Lanthannitratlösung

Die Lösung wird jedesmal frisch angesetzt.

20%ige Natriumacetatlösung:

20 g Natriumacetat

85 ml Aqua dest.

100 mM Lanthannitratlösung:

4,33 g Lanthannitrat

100 ml Aqua dest.

alkalische Silberjodidlösung:

4 g Natriumhydroxid

50 ml Aqua dest.

10 g Kaliumjodid

3,5 ml 1%ige Silbernitratlösung

auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen

Die 1%ige Silbernitratlösung tropfenweise auf einem Magnetrührer zugeben.

Physikalischer Entwickler:

wie 9.3.2.1

9.4 Untersuchte Hunde und anamnestischer Fragebogen

9.4.1 Untersuchte Hunde

Tabelle 4: Sektionstagebuchnummer, Alter, Geschlecht und Erkrankungs- bzw. Todesursache der untersuchten Hunde

Nr.	Tagebuch-Nr.	Alter	Geschlecht	Rasse	Erkrankungs-/Todesursache
1	1731/97	1 M.	m	M	E. coli Sepsis
2	1832/97	1 M.	m	M	E. coli Sepsis
3	1826/97	2 M.	m	DSH	Parvovirose
4	1827/97	2 M.	w	DSH	Parvovirose
5	1813/97	2,5 M.	w	WHT	Parvovirose
6	1825/97	3 M.	w	M	Parvovirose
7	1843/97	3 M.	m	M	hämorrhagische Enteritis, Anämie
8	1878/97	3 M.	m	Yorkshire Terrier	chronische Gastroenteritis, Anämie
9	2029/97	4 M.	w	M	unklar
10	1520/97	5 M.	w	Rottweiler	unklar

11	1749/97	5 M.	m	Dobermann	Parvovirose
12	1545/97	11 M.	m	DSH	Myokardinfarkt
13	1870/97	12 M.	w	DSH	akutes HKV unklarer Ätiologie
14	1801/97	14 M.	w	Riesenschnauzer	unklar
15	1528/97	23 M.	wk	DSH	chronische, katarrhalische Enteritis
16	176/97	2 J.	mk	Rhodesian	HKV unklarer Ätiologie
17	1868/97	2 J.	w	M	Parvovirose
18	2496/97	2 J.	m	WHT	hämorrhagische Diathese unklarer Ätiologie
19	1477/97	3 J.	m	Wachtel	Plasmozytom (Humerus)
20	1759/97	3 J.	m	Golden Retriever	Chylothorax
21	1932/97	3 J.	m	M	hämorrhagische Pneumonie
22	2511/97	3 J.	m	Chihuahua	degenerative Myelopathie nach Bandscheibenvorfällen
23	1541/97	4 J.	m	M	unklar
24	1653/97	4 J.	m	BSH	metastasierendes Adenokarzinom des Pankreas
25	1765/97	4 J.	wk	BSH	Sepsis
26	1892/97	4 J.	m	Dobermann	solides Karzinom an der Hirnbasis (Hypophyse)
27	1897/97	4 J.	w	M	multiple Bandscheibenvorfälle
28	1781/97	5 J.	m	Dalmatiner	Tumor im Wirbelkanal
29	1784/97	5 J.	m	DSH	unklar
30	1914/97	5 J.	m	M	Lymphosarkom
31	1509/97	6 J.		DSH	solides Karzinom im Mediastinum
32	1510/97	6 J.	w	Schweißhund	chronische Glomerulonephritis
33	1693/97	6 J.	m	BSH	anaplastisches Karzinom im perianalem Gewebe
34	1750/97	6 J.	w	Schweißhund	Pankreatitis, Myokarditis, Schrumpfnieren, Urämie
35	1772/97	6 J.	m	BSH	maligne Histiozytose
36	1855/97	6 J.	m	BSH	maligne Histiozytose
37	1701/97	7 J.	w	Langhaardackel	Myelomalazie nach Bandscheibenvorfall
38	1795/97	7 J.	mk	Dackel	unklar
39	2043/97	7 J.	wk	M	genuine Epilepsie, eitrige Pyelitis
40	1471/97	8 J.	m	Rottweiler	chronische retroperitoneale Phlegmone
41	1547/97	8 J.	m	Samojede	Übergangszellkarzinom der Harnblase
42	1773/97	8 J.	w	Pekinese	Pyelonephritis, finale Sepsis
43	1780/97	8 J.	wk	Rottweiler	Plasmozytom im Halswirbel (C3)
44	1801/97	8 J.	w	Riesenschnauzer	Endotoxinschock
45	1802/97	8 J.	w	Labrador	malignes Blastom (Ovar),

46	2026/97	8 J.	wk	DSH	nekrotisierende Pankreatitis
47	1604/97	9 J.	w	Rottweiler	Gastritis, Melaena, Anämie perforierendes Duodenalulkus mit Peritonitis
48	1890/97	9 J.	w	DSH	chronische, nicht-eitrige Nephritis,
49	1875/97	10 J.	w	Boxer	Nebennierenrindenadenom infiltrativ wachsendes einfaches Adenokarzinom des Magens, Schrumpfnieren
50	1902/97	10 J.	m	Yorkshire Terrier	nekrotisierende Pankreatitis
51	2028/97	10 J.	m	Riesenschnauzer	nicht klassif. Sarkom (Anus)
52	2041/97	10 J.	m	Pyrenäenhund	Mesotheliom
53	2042/97	10 J.	w	Deutsch- Kurzhaar	Fibrosarkom (Kiefer)
54	2312/97	10 J.	w	Rottweiler	unklar
55	1476/97	11 J.	m	Mittelschnauzer	chronische, eitrige Bronchopneumonie
56	1707/97	11 J.	w	M	Diabetes mellitus
57	1893/97	11 J.	w	RHD	Endokardruptur (linker Vorhof)
58	1975/97	11 J.	wk	M	Lymphosarkom
59	2307/97	11 J.	w	Fox Terrier	Aortenthrombose
60	2363/97	11 J.	w	WHT	Aspirationspneumonie, Megaösophagus
61	376/98	11 J.	mk	M	malignes Hämangioendotheliom
62	2405/95	12 J.	m	Teckel	akutes HKV, Cystitis, Talgdrüsenadenom
63	1986/96	12 J.	m	M	Diabetes mellitus
64	2209/96	12 J.	m	Pudel	Lymphosarkom
65	2148/97	12 J.	w	Bull Terrier	chronische, fibrinöse Peritonitis
66	2161/96	12 J.	m	Bobtail	Fibrosarkom (L7)
67	1511/97	12 J.	w	Rauhhaardackel	Schock, Nebennierenrindennekrosen
68	1564/97	12 J.	m	M	anaplastisches Prostatakarzinom
69	1923/97	12 J.	wk	M	Diabetes mellitus
70	2090/97	12 J.	m	Eurasier	Magenruptur nach Drehung, Peritonitis
71	2259/97	12 J.	m	Mittelschnauzer	E. coli Sepsis
72	523/98	12 J.	w	M	papilläres Karzinom (Mamma), hämorrhagische Diathesen
73	1584/96	13 J.	wk	Labrador	Leberzirrhose, Schrumpfnieren
74	1709/96	13 J.	m	M	eitrige Prostatitis
75	2530/96	13 J.	m	M	Schrumpfnieren
76	720/97	13 J.	w	DSH	malignes Hämangioendotheliom

77	1105/97	13 J.	w	Rottweiler	metastasierendes Adenokarzinom (Mamma)
78	1561/97	13 J.	w	Setter	Tumor der Pars intermedia der Hypophyse
79	1652/97	13 J.	mk	Airedale Terrier	Pankreasatrophie
80	1952/97	13 J.	wk	M	Lymphosarkom
81	1954/97	13 J.	m	M	Lymphosarkom
82	48/98	13 J.	m	DSH	Fibrosarkom (Ösophagus)
83	179/98	13 J.	w	WHT	einfaches, anaplastisches Adenokarzinom (Mamma)
84	676/98	13 J.	w	M	solides Mammakarzinom
85	707/98	13 J.	w	M	unklar
86	858/98	13 J.	m	Riesenschnauzer	malignes Melanom (Maulhöhle)
87	887/98	13 J.	w	Labrador- Retriever	hepatozelluläres Karzinom
88	2210/96	14 J.	mk	Fox Terrier	Gallengangskarzinom
89	218/97	14 J.	m	Pekinese	multiple Bandscheibenvorfälle
90	505/97	14 J.	wk	M	Lungenthrombose
91	581/98	14 J.	m	Langhaardackel	unklar
92	840/97	14 J.	m	Pudel	Diabetes mellitus
93	1072/97	14 J.	w	M	intraokuläres Melanom
94	1382/97	14 J.	m	Rottweiler	wenig differenziertes Blastom des Magens
95	1583/97	14 J.	m	Dalmatiner	Urolithiasis, multiple Bandscheibenvorfälle
96	1660/97	14 J.	mk	M	degenerative Myelopathie nach Bandscheibenvorfällen, Nebennierenrindennekrosen
97	1756/97	14 J.	m	M	akutes HKV, Leiomyom (Magen), Nebennierenrindennekrosen
98	2083/97	14 J.	mk	Cocker Spaniel	metastasierendes Prostatakarzinom, Phäochromozytom
99	2119/97	14 J.	w	Cocker Spaniel	dilatative Kardiomyopathie
100	2229/97	14 J.	w	M	HKV unklarer Ätiologie
101	2230/97	14 J.	w	M	unklar
102	2364/97	14 J.	m	Pudel	infiltrativ wachsendes Pankreaskarzinom
103	2403/97	14 J.	w	Rauhhaardackel	Herzthrombus, nekrotisierende Pankreatitis
104	274/98	14 J.	m	Dackel	unklar
105	283/98	14 J.	m	Dackel	akutes HKV unklarer Ätiologie
106	500/98	14 J.	m	Chow-Chow	Myelomalazie nach Bandscheibenvorfällen
107	648/98	14 J.	mk	Pudel	Meningeom
108	916/98	14 J.	w	M	Adenokarzinom (Mamma)
109	925/98	14 J.	m	M	akutes HKV unklarer Ätiologie

110	660/99	14 J.	m	M	metastasierendes Pankreaskarzinom
111	268/97	15 J.	mk	DSH	degenerative Myelopathie nach Bandscheibenvorfällen
112	467/97	15 J.	wk	M	akutes HKV, nicht-eitrige Nephritis
113	1150/97	15 J.	w	M	Pyometra, hyperplastische Mastitis
114	1177/97	15 J.	m	M	Leiomyom (Magen)
115	2007/97	15 J.	m	Magyar Vizsla	dilatative Kardiomyopathie
116	2484/97	15 J.	mk	M	unklar
117	127/98	15 J.	w	Shih Tzu	metastasierendes, komplexes Adenokarzinom (Mamma)
118	151/99	15 J.	mk	M	Prostatahyperplasie
119	562/99	15 J.	m	Rauhhaardackel	Adenokarzinom (Nase)
120	536/97	16 J.	w	Teckel	akutes HKV unklarer Ätiologie
121	696/97	16 J.	m	M	Diabetes mellitus
122	1149/97	16 J.	m	DSH	hochgradige Hüftgelenkdysplasie
123	313/98	16 J.	m	M	infiltrativ wachsendes Prostatakarzinom
124	2140/98	16 J.	w	M	Gallengangskarzinom,
125	107/99	16 J.	w	Pudel	Schrumpfnieren
126	150/99	16 J.	m	M	chronische, nicht-eitrige interstitielle Nephritis, Leydigzelltumor
127	288/98	17 J.	w	M	unklar
128	239/98	18 J.	m	M	Urolithiasis, Schrumpfnieren
129	1239/98	18 J.	w	Dackel	multiple Bandscheibenvorfälle, benigner Misch tumor, Adenom (Mamma)
130	15/99	18 J.	m	M	Schrumpfnieren
131	7746/98	9 M.	m.	Marshall Beagle	Toxizitätsstudienkontrolle
132	7747/98	9 M.	m.	Marshall Beagle	Toxizitätsstudienkontrolle
133	7754/98	9 M.	w.	Marshall Beagle	Toxizitätsstudienkontrolle
134	7755/98	9 M.	w.	Marshall Beagle	Toxizitätsstudienkontrolle
135	H-1/99	9 M.	m.	Marshall Beagle	Toxizitätsstudienkontrolle
136	H-2/99	9 M.	m.	Marshall Beagle	Toxizitätsstudienkontrolle
137	H-3/99	9 M.	w.	Marshall Beagle	Toxizitätsstudienkontrolle
138	H-4/99	9 M.	w.	Marshall Beagle	Toxizitätsstudienkontrolle

M. = Monat

J. = Jahr

m = männlich; w = weiblich

wk = weiblich-kastriert

mk = männlich-kastriert

DSH = Deutscher Schäferhund;

BSH = Berner Sennenhund;

WHT = West Highland White Terrier

M = Mischling

HKV = Herz-Kreislaufversagen

9.4.2 Anamnestischer Fragebogen

Fragebogen für den geriatrischen Hund

Alter:

Rasse:

Geschlecht:

Frühere Erkrankungen:

1. Motorik:

normale Körperhaltung	ja []	nein []
Lähmungen/Lahmheiten	ja []	nein []
Krämpfe	ja []	nein []
koordinierte/r Bewegungsabläufe	ja []	nein []
Zwangsbewegungen (Kreisbewegungen, Drangwandern)	ja []	nein []

2. Sensorik:

Erkrankungen an:		
Nase	ja []	nein []
Augen	ja []	nein []
Ohren	ja []	nein []

welche?

3. Mentaler Status:

Apathie []	Stupor []	Koma []
-------------	------------	----------

4. Verhaltensänderungen:

– Besitzer wird nicht mehr erkannt	ja []	nein []
– Futter wird nicht mehr erkannt	ja []	nein []
– Begrüßungsfreude nimmt ab	ja []	nein []
– Gleichgültigkeit gegenüber der Umwelt	ja []	nein []
– Abnahme der Lebhaftigkeit und Spielfreude	ja []	nein []
– Zurückziehen aus sozialem Umfeld	ja []	nein []
– Angst, Schreckhaftigkeit	ja []	nein []
– Bewegungsunlust	ja []	nein []
– Rast-und Ruhelosigkeit	ja []	nein []
– Ungehorsam	ja []	nein []
– mangelhafte Einordnung in Tiergruppen oder Familie	ja []	nein []
– gesteigerte Aggression gegen Besitzer/Tiere	ja []	nein []
– vermehrtes unmotiviertes Bellen	ja []	nein []
– Desorientierung	ja []	nein []
– langes Starren in eine Ecke	ja []	nein []
– zielloses Herumwandern in Haus und Garten	ja []	nein []
– Festhalten an starren Gewohnheiten (Tagesablauf)	ja []	nein []
– mangelhafte Anpassungsfähigkeit an neue Situationen	ja []	nein []
– Verlust erlernter Fähigkeiten	ja []	nein []
– gestörter Schlaf-Wach-Rhythmus	ja []	nein []
– nächtliche Unruhe	ja []	nein []
– gesteigertes Schlafbedürfnis am Tag	ja []	nein []
– Urininkontinenz	ja []	nein []
– Kotinkontinenz	ja []	nein []
– kein gezieltes Markieren beim Spaziergang	ja []	nein []

⇒ weiterhin beobachtete Symptome bitte auf der Rückseite niederschreiben:

9.5 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APP	"amyloid precursor protein", Amyloid-vorläuferprotein
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
Apo	Apolipoprotein
Aqua dest.	Aqua destillata
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
FAD	"familial Alzheimer's disease"
g	Gramm
GFAP	"glial fibrillary acidic protein", saures Gliafaserprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton
MEME	"minimal essential medium" mit Earl'scher Salzlösung und Glutamin
MHC	"major histocompatibility complex", Haupthistokompatibilitätskomplex
m	männlich
mk	männlich-kastriert
M	Molarität
N	Normalität
PS	Presenilin
TBS	"tris buffered saline", Trispuffer
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUF	"target unmasking fluid"
TUNEL	"terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling"
w	weiblich
wk	weiblich-kastriert
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Ich danke einem der außergewöhnlichsten Doktorväter Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D. für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, die hervorragende Betreuung, die Möglichkeit an einem Aufbaustudium in Hannover teilnehmen zu können, für die gleitenden Arbeitszeiten und für sein unermüdliches Engagement mir zu erklären, welche Tumoren gebleicht werden müssen und welche nicht.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. em. E. Weiß danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut für Veterinär-Pathologie in Gießen.

Herr Prof. Dr. M. Reinacher danke ich für die Akzeptanz des Bibliotheksvorzimmers mit seiner aktuellen Inneneinrichtung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Frese bedanken, der mir in der Sektionshalle immer die besten Ideen gab und mir das Gefühl vermittelte, daß sich hinter dem Wort Pathologie mehr verbirgt als das Zerlegen toter Tiere. Darüber hinaus bedanke ich mich für das Rezept des besten Nachtschicks der Welt.

Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt danke ich für geduldige Erklärungen, stete Hilfsbereitschaft und eine unvergessene und erfolgreiche „Hirschfleischverdau-Aktion“.

Meinen langjährigen „Mitmädeln“ aus dem dritten Zimmer rechts im 1. Stock: Gundi, Sibylle und Isabel möchte ich für das wunderbare, manchmal wundersame Mikroklima im Arbeitszimmer und für viele schöne Wochenenden danken.

Annette Artelt danke ich dafür, daß ich im Immunhistolabor Spezialfärbungen durchführen durfte, auch nachdem feststand, daß sich Silberflecken nur mittels Skalpell vom Laborboden entfernen lassen. Darüber hinaus danke ich für die große Hilfe bei der Durchführung der immunhistologischen Arbeiten. Frau Ute Zeller möchte ich für die exzellenten fotografischen Arbeiten danken.

Mein besonderer Dank gilt den Herrn Dr. K. Failing und H. Heiter von der Arbeitsgruppe Biomathematik für die zahlreichen statistischen Analysen und die Hilfe bei deren Interpretation in ruhiger und optimistischer Atmosphäre.

Frau K. Leib aus dem Institut für Neuropathologie in Gießen danke ich für zahlreiche nützliche Hinweise beim Umgang mit den manchmal „neurotischen“ Silberfärbungen.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, allen übrigen Doktoranden und Mitarbeitern des Hauses danke ich für eine sehr schöne Zeit im Institut.

Meinen Eltern danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen, das alles was ich mache gut ist und gut endet.

Tobias danke ich für die wunderbare gemeinsame Zeit und die geduldige Hilfe bei Systemzusammenbrüchen des Computers oder der Autorin selbst.